

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



Facoltà di Medicina Veterinaria
Sezione di Microbiologia e Immunologia
Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria

Corso di Dottorato in Biotecnologie Applicate
alle Scienze Veterinarie e Zootecniche
Coordinatore: Prof. Fulvio Gandolfi

Determinazione delle caratteristiche fenotipiche e
genotipiche di ceppi di *Staphylococcus* in relazione a
meticillino- e vancomicino-resistenza

TESI DI:
Manuela Maria Ferretti
Matr. n. R08119

TUTOR: Prof. Paola Dall'Ara

Anno accademico 2010-2011

INDICE

PREMESSA	pag.1
1 GLI STAFILOCOCCI	3
1.1 GENERALITÀ	3
1.2 STRUTTURA	6
1.3 DISTRIBUZIONE	9
1.4 PATOGENI OPPORTUNISTI	15
1.5 STAFILOCOCCI DI INTERESSE NELLA PATOLOGIA DEGLI ANIMALI DA COMPAGNIA	19
1.5.1 <i>Staphylococcus intermedius</i>	21
1.5.2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	22
1.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	24
1.5.4 <i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	26
1.5.5 Stafilococchi coagulasi-negativi	27
2 ANTIBIOTICO RESISTENZA	29
2.1 ASPETTI GENERALI	29
2.2 MECCANISMI DI SVILUPPO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA	33
2.3 TRASFERIMENTO DI MATERIALE GENICO NEI BATTERI	39
2.4 RUOLO DEL BIOFILM NELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA	48
2.5 CONTROLLO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA	49
2.6 <i>S. PSEUDINTERMEDIUS</i> E RESISTENZA ANTIBIOTICA	54
2.7 ANTIBIOTICI BETA-LATTAMICI	55
2.7.1 METICILLINA	58

2.7.2	RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI-LATTAMICI: <i>blaZ</i> E <i>mecA</i>	60
2.7.3	METICILLINO-RESISTENZA.....	65
2.7.3 A	- SCC <i>mec</i> I-V	68
2.7.3 B	- SCC non- <i>mec</i>	69
2.7.3 C	- Distribuzione dei tipi di SCC <i>mec</i>	70
2.7.3 D	- Origine e <i>reservoir</i> di SCC <i>mec</i>	71
2.7.4	BORSA	72
2.8	ANTIBIOTICI GLICOPEPTIDICI	75
2.8.1	VANCOMICINA.....	76
2.8.2	VANCOMICINO-RESISTENZA.....	78
2.8.2 A	- VISA e Hvisa.....	79
2.8.2 B	- VRSA	83
2.9	ANTIBIOTICI FLUORCHINOLONICI.....	88
2.9.1	FLUORCHINOLONE-RESISTENZA.....	89
2.9.2	FLUORCHINOLONI AD USO VETERINARIO	92
3	ASPETTI ZONOSICI.....	95
4	SCOPO DEL LAVORO	102
5	MATERIALI e METODI	103
5.1	RACCOLTA DEI CAMPIONI E PRELIMINARE TIPIZZAZIONE DEI CEPPI	103
5.2	HRM PER L'IDENTIFICAZIONE DEI CEPPI.....	105
5.3	VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ DEI CEPPI ISOLATI AI CHEMIOANTIBIOTICI	106
5.3.1	PCR per il rilevamento di <i>gyrA</i> e <i>griA</i>	108

5.4	PCR PER IL RILEVAMENTO DEL GENE <i>mecA</i>	110
5.5	PROTEOMICA PER IL RILEVAMENTO DELLA PROTEINA PBP2a.....	113
6	RISULTATI e DISCUSSIONE	117
6.1	IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA DEI CEPPI.....	117
6.2	IDENTIFICAZIONE CON METODO MOLECOLARE HRM.....	119
6.3	<i>PATTERN</i> DI SENSIBILITÀ ANTIBIOTICA E MULTIRESISTENZA.....	122
6.4	RILEVAMENTO DEL GENE <i>mecA</i> E MIC PER METICILLINA E VANCOMICINA.....	130
6.5	PROTEOMICA PER LA PROTEINA PBP2a	134
7	CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI.....	136
8	BIBLIOGRAFIA.....	143

PREMESSA

Le malattie infettive nella storia hanno rappresentato una delle minacce principali alla salute umana e animale, un'importante causa di mortalità. L'introduzione in terapia degli agenti antimicrobici negli anni trenta (con i sulfamidici) e negli anni quaranta (con la penicillina) ha rivoluzionato la medicina umana riducendo in modo sostanziale i tassi di morbilità e mortalità causati da patologie batteriche. È stato però osservato dopo breve tempo che i batteri potevano diventare resistenti agli antimicrobici e ceppi resistenti hanno cominciato a emergere poco dopo l'introduzione di ogni nuovo farmaco antibatterico.

Staphylococcus aureus, associato ad un tasso di mortalità di oltre l'80% nell'epoca precedente l'era degli antibiotici, rappresenta uno degli agenti batterici in grado di causare patologie potenzialmente letali nell'uomo, accanto ad *Escherichia coli* e a *Streptococcus pneumoniae*. Trattati con le penicilline, gli stafilococchi hanno sviluppato meccanismi di resistenza che li hanno portati a sopravvivere a terapie con β -lattamici di ultima generazione come la meticillina, favorendo la diffusione, prima negli ospedali e poi nella popolazione, di ceppi cosiddetti MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*).

La *World Health Organization* (WHO) monitora costantemente l'aumento della prevalenza di MRSA, segnalando con preoccupazione il problema della meticillino-resistenza negli stafilococchi, alla luce del notevole incremento delle prevalenze; secondo i dati dell'*European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), relativamente ai Paesi dell'Europa centrale, si è osservato un preoccupante aumento negli isolamenti di MRSA dall'1.7% nel 1990, al 20.3% nel 2001, al 22.6% nel 2005, mentre per il 2010 in alcuni Paesi dell'Unione Europea (UE) in cui la prevalenza è attorno al 25%. In altri Paesi dell'EU si assiste invece a una stabilizzazione o a una riduzione degli

isolamenti in ambito umano (Austria, Cipro, Estonia, Francia, Grecia, Irlanda e Inghilterra), anche se il problema resta pressante (**WHO, 2004; EARSS, 2010**).

Attualmente si assiste ad una graduale diffusione, tra i ceppi di *S. aureus* di origine umana, anche della resistenza agli antibiotici glicopeptidici, in particolare alla vancomicina, che viene utilizzata in terapia come farmaco di ultima linea per il trattamento di infezioni da ceppi meticillino-resistenti. Non vi sono per ora segnalazioni di ceppi di *S. aureus* isolati da animali, né di altre specie di origine animale che presentino una resistenza completa o anche intermedia alla vancomicina, ma potrebbe essere interessante comprendere nel monitoraggio delle antibiotico-resistenze anche questo farmaco.

La crescente diffusione di resistenze batteriche ai farmaci antimicrobici, tra cui il recente emergere della meticillino-resistenza anche in medicina veterinaria, prima in ceppi trasferiti da uomo ad animale (MRSA) poi in ceppi specificamente di origine animale (*S. pseudintermedius* – MRSP) ha sollevato la necessità di un uso più attento degli antimicrobici in terapia, nonché di un costante monitoraggio dell'evoluzione di questa resistenza antibiotica negli stafilococchi di origine veterinaria, a causa della loro pericolosità in quanto estremamente diffusi e facilmente trasferibili, insieme alle resistenze antibiotiche, da uomo ad animale e da animale all'uomo.

1. GLI STAFILOCOCCI

1.1 GENERALITÀ

Il nome *Staphylococcus* (σταφυλή, grappolo) è stato introdotto da Ogston nel 1883 per identificare un gruppo di micrococchi in grado di causare flogosi e suppurazione. È stato il primo a differenziare due tipi di cocchi piogeni: uno organizzato in ammassi irregolari che ha denominato “*Staphylococcus*” e un altro con disposizione a catenelle che ha chiamato “*Streptococcus*”. Nel 1886 i generi *Staphylococcus* (anaerobi-facoltativi) e *Micrococcus* (aerobi-obbligati) sono stati separati (Götz, 1981). Questi microrganismi colonizzano comunemente la superficie della pelle e delle mucose di mammiferi e uccelli, il primo genere con specie frequentemente patogene sia in medicina umana sia veterinaria, ad esempio *S. aureus* o *S. pseudintermedius*, il secondo genere è generalmente considerato un saprofito. Entrambi i generi appartengono alla famiglia delle *Micrococcaceae*, ma analisi genetiche hanno dimostrato che non sono correlati. *Micrococcus* è correlato al genere *Arthrobacter*, mentre *Staphylococcus* è più strettamente associabile a streptococchi, enterococchi e lattobacilli (De la Maza, 2004).

Gli stafilococchi sono cocchi catalasi-positivi e Gram-positivi, del diametro di 0,8-1,5 μm ; annoverano 36 specie (Tab. 1, pag. 2), più della metà delle quali possono essere ritrovate in campioni clinici. Immobili, asporigeni e privi di una capsula evidente, crescono bene nei comuni terreni di coltura. Su terreni solidi producono colonie di 2-3 mm di diametro, rotonde e a margini netti, convesse, lisce, opache e con pigmentazione aurea, bianca o più raramente citrea. Si sviluppano tra 10 e 45°C, con una temperatura ottimale compresa tra 30 e 37°C, ad un pH tra 4 e 9, con un *optimum* tra 7.0 e 7.5.

Dal punto di vista metabolico gli stafilococchi utilizzano il sistema completo dei citocromi quando crescono in presenza di ossigeno, mentre in ambiente anaerobio presentano un metabolismo

1. GLI STAFILOCOCCI

energetico fermentativo. La maggior parte delle specie contiene i citocromi di tipo a e b. *S. lentus*, *S. sciuri* e *S. vitulus* contengono citocromi di tipo a, b e c.

Nome della specie di <i>Staphylococcus</i>	Ospiti naturali	Riferimenti (1° descrizione)
<i>S. arlettae</i>	Mammiferi, uccelli	Schleifer et al., 1984
<i>S. auricularis</i>	Uomo, primati	Kloos e Schleifer, 1983
<i>S. aureus</i> :		Rosenbach, 1884
<i>S. aureus</i> ssp. <i>anaerobius</i>	Ovini	De la Fuente et al., 1985
<i>S. aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	Uomo, mammiferi, uccelli	De la Fuente et al., 1985
<i>S. capitis</i> :		Kloos e Schleifer, 1975
<i>S. capitis</i> ssp. <i>capitis</i>	Uomo	Bannermann e Kloos, 1991
<i>S. capitis</i> ssp. <i>urealitycus</i>	Uomo, alcuni primati	Bannermann e Kloos, 1991
<i>S. caprae</i>	Uomo, caprini	Devriese et al., 1983
<i>S. carnosus</i> :		Schleifer e Fischer, 1982
<i>S. carnosus</i> ssp. <i>carnosus</i>	Carne e prodotti ittici, NN	Probst et al., 1998
<i>S. carnosus</i> ssp. <i>utilis</i>	Carne e prodotti ittici, NN	Probst et al., 1998
<i>S. chromogenes</i>	Bovini, equini, caprini	Devriese et al., 1978
<i>S. cohnii</i> :		Schleifer e Kloos, 1975
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	Uomo	Kloos e Wolfshohl, 1983
<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	Uomo, primati	Kloos e Wolfshohl, 1983
<i>S. condimentii</i>	Salsa di soia	Probst et al., 1998
<i>S. delphini</i>	Delfini, piccioni, cavalli, visoni	Varaldo et al., 1988
<i>S. epidermidis</i>	Uomo, (mamm. domestici)	Winslow e Winslow, 1908
<i>S. equorum</i>	Equini, bovini	Schleifer et al., 1984
<i>S. felis</i>	Felini	Igimi et al., 1989
<i>S. fleurettii</i>	Formaggio di capra, carne trita	Vernozy-Rozand et al., 2000
<i>S. gallinarum</i>	Pollame, uccelli	Devriese et al., 1983
<i>S. haemolyticus</i>	Uomo, primati, (mamm. domestici)	Schleifer e Kloos, 1975
<i>S. hominis</i> :		Kloos e Schleifer, 1975
<i>S. hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	Uomo	Kloos et al., 1998
<i>S. hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>	Uomo	Kloos et al., 1998
<i>S. hyicus</i>	Suini, bovini, caprini	Devriese et al., 1978
<i>S. intermedius</i>	Mammiferi, piccioni	Hàjek, 1976
<i>S. kloosii</i>	Mammiferi	Schleifer et al., 1984
<i>S. lugdunensis</i>	Uomo	Freny et al., 1988
<i>S. lutrae</i>	Lontre	Foster et al., 1997
<i>S. muscae</i>	Mammiferi domestici, (mosche)	Hàjek et al., 1992
<i>S. pasteurii</i>	Alimenti	Chesneau et al., 1993
<i>S. piscifermentans</i>	Pesce fermentato	Tanasupawat et al., 1992
<i>S. pseudintermedius</i>	Cani, cavalli, mammiferi	Devriese et al., 2005
<i>S. pulvereri</i> (= <i>S. vitulinus</i>)	Uomo, mammiferi	Zakrewska-Czerwinska al., 1995
<i>S. saccharolyticus</i>	Uomo	Klipper-Bälz e Schleifer, 1981
<i>S. saprophyticus</i> :		Schleifer e Kloos, 1975

1. GLI STAFILOCOCCI

<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>bovis</i>	Uomo, mammiferi	Hàjek et al., 1996
<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>saproph.</i>	Uomo, mammiferi	Hàjek et al., 1996
<i>S. schleiferi</i> :		Frenay et al., 1988
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Cane	Igimi et al., 1990
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Infezioni umane, NN	Igimi et al., 1990
<i>S. sciuri</i> :	Mammiferi, uccelli	Kloos et al., 1976
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	Bovini	Kloos et al., 1997
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>	Capre, latte, uomo, mosca	Kloos et al., 1997
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	Ratti, scoiattoli, reparti neonatali	Kloos et al., 1997
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Roditori, bovini, cavalli, cani	Kloos et al., 1997
<i>S. simulans</i>	Uomo, mammiferi	Kloos e schleifer, 1975
<i>S. succinus</i>	Ambra dominicana	Lambert et al., 1998
<i>S. vitulinus</i>	Prod. carnei, mamm. dom., balene	Webster et al., 1994
<i>S. warneri</i>	Uomo, primati, mamm. Domestici	Kloos e Schleifer, 1975
<i>S. xylosus</i>	Alimenti	Schleifer e Kloos, 1975

Tab. 1: Elenco delle specie e subspecie del genere *Staphylococcus*. Le parentesi indicano che il batterio è solo transitorio sull'ospite. NN: non noto. (Götz, 2006; Kloos, 1994)

La crescita degli stafilococchi è più rapida e abbondante in condizioni di aerobiosi, con l'eccezione di *S. saccharolyticus* e di *S. aureus* subsp. *anaerobius*, che sono anche catalasi-negativi (Götz, 2006).

Pur non essendo sporigeni, gli stafilococchi mostrano una notevole resistenza a condizioni ambientali sfavorevoli. Ne è un esempio la loro notevole alofilia che li rende capaci di svilupparsi anche in presenza di concentrazioni elevate di NaCl (7,5%), tali da inibire lo sviluppo della maggior parte degli altri batteri (La Placa, 2008).

La maggior parte delle specie di stafilococco cresce abbondantemente su agar sangue entro 18-24 ore. La gran parte degli stafilococchi di maggior interesse medico cresce tanto nella parte più superficiale quanto in quella più profonda (anaerobia) del brodo di tioglicollato o in agar semisolido.

1. GLI STAFILOCOCCI

Possiamo raggruppare le diverse specie di stafilococchi sulla base di studi di ibridazione del DNA; le più importanti sono quelle coagulasi-negative (CoNS) e sensibili alla novobiocina con *S. epidermidis* (ad esempio *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus* e *S. warneri*) e *S. simulans* (ad esempio *S. carnosus* e *S. simulans*) le specie coagulasi-negative e resistenti alla novobiocina comprendono *S. saprophyticus* (ad esempio, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*) e *S. sciuri* (ad esempio *S. lentus*, *S. sciuri* e *S. vitulus*), mentre i due gruppi di specie coagulasi-positive e sensibili alla novobiocina comprendono *S. intermedius* (ad esempio *S. delphini*, *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*) e *S. aureus* (ad esempio *S. aureus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*).

Le dimensioni del genoma degli stafilococchi è nel *range* di 2000-3000 kb (Götz, 2006).

1.2 STRUTTURA

L'ultrastruttura e la composizione chimica della parete cellulare degli stafilococchi è simile a quella degli altri batteri Gram-positivi. Il suo spessore è generalmente di 60-80 nm, piuttosto omogeneo. E' costituita da un polimero di grandi dimensioni detto peptidoglicano (o mucopeptide batterico o mureina), acido teicoico e proteine. Il peptidoglicano batterico è costituito da un'unità strutturale formata da due carboidrati azotati, la N-acetilglucosamina (costituente di diversi materiali biologici) e l'acido N-acetilmuramico (componente assolutamente specifico della parete batterica). Nel polimero peptidoglicanico l'acido N-acetilmuramico di un'unità strutturale è legato alla N-acetilglucosamina dell'unità successiva (legame scisso dal lisozima o muramidasi, enzima ampiamente diffuso in materiali biologici come albume, lacrime, saliva, latte, ecc.), portando alla formazione di lunghe macromolecole lineari. I diversi polimeri lineari sono poi collegati

1. GLI STAFILOCOCCI

trasversalmente tra loro in corrispondenza delle catene aminoacidiche (tetrapeptide) (**La Placa, 2008**). Una caratteristica del peptidoglicano stafilococcico è la frequente presenza di ponti interpeptidici ricchi in glicina; ponti penta- ed esa-glicinici sono stati rilevati in circa metà delle specie di stafilococchi, con legame tra l'aminogruppo della L-lisina ed il gruppo carbossilico della D-alanina adiacente (peptidoglicano di tipo Lys-Gly₅₋₆). Nella maggior parte delle altre specie una porzione dei residui di glicina è sostituita da L-serina (peptidoglicano di tipo Lys-Gly₄, Ser). *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. fleuretti* e *S. vitulus* possono avere un residuo di L-alanina, invece di uno di glicina, legato alla lisina della subunità peptidoglicanica (peptidoglicano di tipo Lys-Ala-Gly₄) (**Götz, 2006**).

Nei batteri Gram-positivi la membrana citoplasmatica è protetta da una parete cellulare molto spessa che circonda e racchiude completamente il batterio, formata da numerosi strati di peptidoglicano con intersecate minori quantità di altri polimeri, rappresentati essenzialmente dagli acidi teicoici (τεῖχος = muro). Gli acidi teicoici della parete cellulare degli stafilococchi sono polimeri idrosolubili e contengono gruppi fosfodiesterici che sono legati covalentemente al peptidoglicano. Consistono di zuccheri polioliici (glicerolo o ribitolo) e/o di zuccheri *N*-acetilaminici. Il ricorrere degli stessi componenti principali non significa che la struttura dell'acido teicoico sia sempre identica; ad esempio la struttura degli acidi teicoici di *S. capitis* e di *S. hyicus* mostra una composizione simile ma le loro strutture sono piuttosto differenti. Gli acidi teicoici sono altamente antigenici e la loro funzione è ancora ipotetica. Alcuni di essi sono legati ad una porzione lipidica (acidi lipoteicoici) e pare servano ad ancorare la parete cellulare alla membrana citoplasmatica sottostante.

La spessa parete cellulare dei batteri Gram-positivi è una struttura altamente polare dovuta alle cariche degli amminozuccheri e degli aminoacidi del peptidoglicano e ai radicali fosforici degli acidi teicoici. Per queste caratteristiche la parete cellulare si oppone al passaggio delle molecole idrofobiche, in grado di danneggiare la struttura della membrana citoplasmatica, mentre risulta

1. GLI STAFILOCOCCI

permeabile alle molecole idrofile, per cui molecole come gli zuccheri o gli aminoacidi possono facilmente attraversarla raggiungendo la membrana citoplasmatica. Lo spesso strato di peptidoglicano e gli acidi teicoici intercalati non rappresentano, comunque, un particolare ostacolo al passaggio di alcune molecole di grandi dimensioni purchè idrofile, e consentono l'esportazione di una serie di proteine sintetizzate all'interno della cellula (esoenzimi, tossine, ecc.). Inoltre le caratteristiche di polarità della parete batterica le consentono di legare grandi quantità di cationi che hanno probabilmente il compito di garantire un ambiente ionico adeguato al funzionamento degli enzimi presenti nella membrana citoplasmatica e, in particolare, a quelli preposti alla sintesi del peptidoglicano e al suo corretto "inserimento" nella struttura della parete che richiedono, ad esempio, adeguate concentrazioni di Mg^{++} . La caratteristica della parete di fissare notevoli quantità di cationi consente ai batteri Gram-positivi di tollerare nell'ambiente concentrazioni saline molto più elevate rispetto ai Gram-negativi. Un esempio estremo di questa caratteristica sono proprio gli stafilococchi con la loro notevole alofilia. Inoltre la struttura rigida della parete cellulare consente ai Gram-positivi di sopravvivere in ambiente ipotonico non permettendo l'assunzione di acqua dall'esterno oltre il limite di distensione della parete stessa, impedendo così la lisi cellulare, altrimenti inevitabile in assenza di meccanismi fisiologici di controllo del bilancio idrico intracellulare (ad esempio con vacuoli pulsanti) (**La Placa, 2008**).

La classificazione di specie e sottospecie degli stafilococchi si basa sull'analisi delle diverse caratteristiche fenotipiche e genotipiche. Inoltre l'analisi dell'rRNA e del ribotipo può essere usata per descrivere le relazioni tra i ceppi di riferimento e le nuove specie. L'omologia tra i DNA (>70%) è il criterio che è stato usato per determinare il legame tra le specie nella loro classificazione formale e della maggior parte delle sottospecie di stafilococchi.

Le caratteristiche chiave attualmente utilizzate per l'identificazione di specie e sottospecie dei ceppi includono: morfologia delle colonie, richiesta di ossigeno, coagulasi, *clumping factor*,

1. GLI STAFILOCOCCI

nucleasi termostabile (termonucleasi), emolisine, catalasi, ossidasi, fosfatasi alcalina, ureasi, ornitina decarbossilasi, pirrolidonil arilamidasi, β -galattosidasi, produzione di acetoina, riduzione del nitrato, idrolisi dell'esculina, produzione aerobia di acido da una varietà di carboidrati (tra cui D-trealosio, D-mannitolo, D-mannosio, D-turanosio, D-xilosio, D-cellobiosio, L-arabinosio, maltosio, α -lattosio, saccarosio e raffiniosio), resistenza intrinseca a novobiocina e polimixina B. Nella pratica di laboratorio l'identificazione di specie viene effettuata con kit rapidi o con sistemi automatizzati che richiedono da poche ore a una giornata per la lettura del *test* (ad esempio API-Staph[®] – BioMérieux, RapID Staph Plus – Oxoid, ecc.). L'identificazione di un gran numero di specie di *Staphylococcus* di origine umana può essere effettuata con un'accuratezza del 70-90% usando i sistemi commerciali (Götz, 2006). I *kit* diagnostici disponibili non sono però specifici per le specie di origine veterinaria e spesso la percentuale di probabilità dell'esattezza dell'identificazione dei ceppi di origine animale risulta troppo bassa per essere affidabile (Cunha, 2004; Park, 2011).

1.3 DISTRIBUZIONE

I membri del genere *Staphylococcus* sono diffusi in natura e occupano una varietà di nicchie. Come risultato della loro ubiquitarità e adattabilità gli stafilococchi sono il maggior gruppo di batteri abitanti cute, ghiandole cutanee e mucose di mammiferi e uccelli. La grande varietà di *habitat* nell'ecosistema cutaneo umano può essere distinta in base alle differenze nella densità e nella struttura delle comunità microbiche che li abitano, oltre che dalle caratteristiche anatomiche e fisiologiche. Per esempio le regioni cutanee dotate di un gran numero di unità pilosebacee, ghiandole sudoripare e membrane mucose che si aprono sulla superficie del corpo, contengono la più ampia comunità di stafilococchi. In aggiunta si possono trovare nei canali follicolari,

1. GLI STAFILOCOCCI

nell'apertura delle ghiandole sudoripare, nel lume dei follicoli sebacei e sulla superficie e sotto le scaglie epiteliali desquamanti.

Gli stafilococchi si trovano sulla cute come organismi residenti o transienti; i batteri residenti mantengono una popolazione relativamente stabile e aumentano il loro numero soprattutto attraverso la moltiplicazione dei microrganismi già presenti. I batteri transienti derivano da fonti esogene, si trovano principalmente sulla cute esposta e possono essere facilmente lavati via. Una contaminazione crociata da parte degli stafilococchi può verificarsi ove differenti specie ospiti entrano in contatto l'una con l'altra, ma laddove la speciespecificità è alta, i microrganismi di passaggio vengono eliminati in alcune ore o giorni, a meno che le normali barriere di difesa siano compromesse. Studi ecologici hanno indicato alcune evidenti preferenze di ospiti e nicchie da parte di alcune specie di stafilococchi (Götz, 2006).

Staphylococcus epidermidis è la prevalente e più persistente specie di *Staphylococcus* sulla cute umana. Si trova su gran parte della superficie del corpo ed è responsabile di un'elevata colonizzazione ove il contenuto di umidità e di nutrienti sono elevati, come ad esempio a livello di cavità nasali, ascelle, area inguinale e perineale, membrane interdigitali. Questa specie può essere evidenziata anche su altri ospiti, come gli animali domestici, ma è presumibilmente di origine umana.

Anche *Staphylococcus hominis* è presente sulla cute umana; le cariche sono di poco inferiori o a volte eguagliano quelle di *S. epidermidis* in zone della cute dove le ghiandole apocrine sono numerose (ad esempio a livello di ascelle, inguine e perineo). Può anche colonizzare regioni cutanee più "asciutte" (ad esempio le estremità degli arti) con maggiore successo rispetto ad altre specie.

1. GLI STAFILOCOCCI

Staphylococcus haemolyticus condivide molti degli *habitat* di *S. hominis*, ma di solito è presente con un minor livello di colonizzazione, anche se alcuni soggetti possono veicolare eccezionalmente *S. haemolyticus* con elevata contaminazione. Una diversa sottospecie di *S. haemolyticus* isolata dalla cute di primati non umani può essere distinta da quelle adattate all'uomo sulla base di *test* di ibridazione del DNA, ma poiché è difficile distinguere *S. haemolyticus* di primati non umani dalle specie consimili, questo è stato provvisoriamente denominato "*S. simians*" (Götz, 2006).

Staphylococcus warneri è isolato in piccole concentrazioni dalla cute umana, sebbene su alcuni individui vi sia un elevato livello di contaminazione. È una delle principali specie che colonizzano i primati non umani, soprattutto i più evoluti Cercopitecoidi e Pongidi. Occasionalmente possono essere isolate dagli animali domestici piccole popolazioni di passaggio di *S. haemolyticus* o *S. warneri*.

Staphylococcus capitis colonizza abbondantemente il cuoio capelluto umano dopo la pubertà. È isolato anche da altre regioni della testa degli adulti come fronte, faccia, sopracciglia e condotto uditivo esterno. La più ampia colonizzazione è rilevata in aree in cui le ghiandole sebacee sono numerose e ben sviluppate. *S. capitis* subsp. *ureolyticus* è presente sulla testa in piccola quantità e, come *S. capitis*, può essere isolato anche da altre parti del corpo. Queste specie sono state isolate sia da primati umani sia non umani.

Staphylococcus caprae, in origine isolato dalla cute e dal latte di capre domestiche, è stato isolato anche da campioni clinici umani.

Staphylococcus hominis subsp. *novobiosepticus*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. schleiferi* sono altre specie di rilevanza clinica isolate da campioni umani ma la loro nicchia ecologica originaria è ancora sconosciuta (Götz, 2006).

1. GLI STAFILOCOCCI

Staphylococcus auricularis è una delle maggiori specie che vivono sull'uomo adulto, con spiccata preferenza per il condotto uditivo esterno. Una diversa sottospecie di *S. auricularis* si trova nell'orecchio e in ghiandole specializzate per la marcatura odorosa di primati non umani.

Staphylococcus aureus è una delle principali specie isolate dai primati, anche se biotipi specifici possono occasionalmente colonizzare diversi animali domestici e uccelli. Questa specie è isolabile raramente anche da animali selvatici non primati. Nell'uomo *S. aureus* ha come nicchia di preferenza le cavità nasali, soprattutto nell'adulto; qui può trovarsi come microrganismo transiente o come residente della normale flora batterica. *S. aureus* aderisce selettivamente alle cellule epiteliali della mucosa nasale. La percentuale di trasporto di *S. aureus* nella normale popolazione adulta umana non ospedalizzata va dal 10 a più del 40%. *S. aureus* subsp. *anaerobius* è stato trovato sulle pecore (Götz, 2006).

La gamma di ospiti di *Staphylococcus saprophyticus* e delle specie simili (*S. cohnii* e *S. xylosus*) va dall'uomo agli altri mammiferi e agli uccelli, con prevalenza tra primati e mammiferi. *S. saprophyticus* è evidenziato di solito in piccole popolazioni di passaggio sulla cute dell'uomo e di altri primati. Questa specie possiede caratteristiche di superficie che le permettono di aderire con facilità alle cellule urogenitali; può anche essere isolata dai mammiferi meno evoluti e da fonti ambientali. *S. saprophyticus* subsp. *bovis* è isolabile dalle cavità nasali di bovini.

Staphylococcus cohnii si trova come specie temporaneamente residente o transiente sulla cute umana, e talvolta anche *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, sebbene sia in realtà una delle principali specie isolabili da primati non umani, soprattutto i meno evoluti.

Staphylococcus xylosus si trova spesso come specie transiente sulla cute di primati ed altri mammiferi e, occasionalmente, sulla cute degli uccelli. Una specie correlata, *S. kloosii*, è stata isolata da molti mammiferi diversi, inclusi marsupiali selvatici, roditori e carnivori; meno

1. GLI STAFILOCOCCI

frequentemente nei mammiferi domestici. *S. arlettae* è stato isolato da volatili da cortile e capre, *S. equorum* dai cavalli, *S. gallinarum* dal pollame (**Götz, 2006**).

Staphylococcus pseudintermedius (precedentemente confuso con *S. intermedius*) è la principale specie del cane domestico. Si trova abbondantemente sulla cute del cane e può occasionalmente essere trasferita alla cute degli umani per contatto. *S. pseudintermedius* sembra essere una specie indigena di una gran varietà di altri carnivori, inclusi il visone, la volpe e il procione. È stato isolato anche da cavalli e piccioni.

S. intermedius è stato isolato soprattutto dal piccione selvatico (**Devriese, 2005; Sasaki, 2007; Devriese, 2009**).

Staphylococcus felis è una delle specie principali del gatto domestico.

Staphylococcus schleiferi è distinto in subsp. *schleiferi* e subsp. *coagulans*. Quest'ultima è una specie coagulasi-positiva isolata dal condotto uditivo esterno di cani con infezioni in atto, mentre *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, coagulasi-negativo, è responsabile di un'ampia gamma di infezioni nosocomiali, tra cui batteriemie, ascessi cerebrali, infezioni di *pacemaker*, di cateteri endovenosi e urinari, di impianti ortopedici e di ferite chirurgiche (**Peacock, 1999**).

Altre specie coagulasi-positive isolate dagli animali includono *Staphylococcus delphini* e *S. lutrae*. *Staphylococcus sciuri*, *S. sciuri* subsp. *carnaticus* e *S. sciuri* subsp. *rodentium* sono stati isolati da piccoli mammiferi e animali domestici. Inoltre, le sottospecie di *S. sciuri* possono essere isolate da campioni clinici umani. *S. sciuri* è ritenuto un *reservoir* naturale di geni per la meticillino-resistenza e di enzimi stafilolitici. Il suo ruolo però nella comparsa della meticillino-resistenza nelle specie più patogene non è stato ancora ben determinato (**Loeffler, 2005; Fuda, 2005**).

1. GLI STAFILOCOCCI

Staphylococcus hyicus, coagulasi-positivo, e *Staphylococcus chromogenes*, coagulasi-negativo, sono predominanti negli ungulati domestici come suini, bovini ed equini, ma sono isolabili anche dalla cute dei piccoli animali domestici (**Abraham, 2007**).

Grandi concentrazioni di *Staphylococcus lentus* sono state isolate dagli ovini, occasionalmente su altri animali domestici, ed è il principale batterio presente nella saliva del coniglio.

Gli stafilococchi sono stati isolati sporadicamente da un'ampia varietà di fonti ambientali come suolo, spiagge sabbiose, acqua di mare, acqua dolce, vegetali, foraggio, carne, pollame, prodotti caseari e sulla superficie di cucine, utensili, mobili, abiti, coperte, tappeti, biancheria, moneta cartacea, nella polvere e nell'aria in vari centri abitati. *S. carnosus*, *S. carnosus* subsp. *utilis*, *S. condimenti*, *S. fleurettii*, *S. piscifermentans* e *S. vitulus* sono stati isolati da vari prodotti alimentari. Alcune di queste specie possono essere coinvolte in intossicazioni alimentari e in fermentazioni indesiderabili degli alimenti. È stata descritta anche la specie *S. succinus*, isolata da ambra dominicana (**Lambert, 1998**).

Con l'eccezione dei prodotti di origine animale la maggior parte delle fonti ambientali ha un'esigua contaminazione da stafilococchi transienti, molti dei quali sono probabilmente contaminanti diffusi dall'uomo, da altri mammiferi o da uccelli in quanto ospiti portatori. Alcune specie (ad esempio *S. sciuri* e *S. xylosus*) possono crescere in *habitat* contenenti solo una fonte di azoto inorganico; queste specie sono state isolate in numero esiguo da spiagge, acque naturali, paludi e da prodotti di origine vegetale.

Insetti del genere *Musca*, *Fannia* e *Stomoxys*, in genere presenti dove vivono uomini e animali, possono avere un ruolo epidemiologico significativo veicolando popolazioni di stafilococchi (**Götz, 2006**).

1.4 PATOGENI OPPORTUNISTI

Storicamente le specie di stafilococchi coagulasi-negative (CoNS) sono state considerate a bassa patogenicità rispetto a quelle coagulasi-positive. In realtà vari studi hanno dimostrato il potenziale patogeno delle specie coagulasi-negative, sia nell'uomo che nei piccoli animali (soprattutto nel cane, mentre nel gatto segnalazioni di ceppi coagulasi-negativi sono rare) (**Abraham, 2007**).

S. aureus, fin dalla sua scoperta come patogeno opportunisto, continua ad essere un'importante causa di mortalità nell'uomo ed è responsabile di un gran numero di infezioni. Dai tardi anni cinquanta e primi anni sessanta *S. aureus* è stato considerato un patogeno nosocomiale, con alta morbilità e mortalità. *S. aureus* è causa di diverse infezioni umane: piodermiti, con la comparsa di foruncoli, pustole e impetigine, necrosi epidermica tossica (sindrome da cute ustionata), polmonite, osteomielite, endocardite acuta, miocardite, pericardite, enterocolite, mastite, cistite, prostatite, cervicite, encefalite, meningite, batteriemia, sindrome da *shock* tossico e ascessi di muscoli, cute, tratto urogenitale, sistema nervoso centrale e altri organi intraddominali. Inoltre l'enterotossina stafilococcica è coinvolta in casi di intossicazione alimentare. Ceppi meticillino-resistenti di *S. aureus* (MRSA) sono divenuti negli anni ottanta uno dei principali problemi clinici ed epidemiologici negli ospedali (H-MRSA); in seguito si sono diffusi nelle comunità (CA-MRSA) (**Götz, 2006**).

S. aureus può infettare anche una ampia varietà di mammiferi e uccelli. Le più comuni infezioni negli animali includono mastiti, sinoviti, artriti, endometriti, foruncoli, dermatiti suppurative, piemia e setticemia. *S. aureus* subsp. *anaerobius* è l'agente eziologico di una patologia ascessuale nella pecora, sintomatologicamente simile alla linfadenite caseosa (**De La Fuente, 1985**).

1. GLI STAFILOCOCCI

S. intermedius (ora *S. pseudintermedius*) è un importante patogeno opportunista del cane ed è causa di otite esterna, piodermite, ascessi, infezioni del tratto riproduttivo, mastiti e infezioni purulente di ferite.

S. hyicus viene considerato l'agente eziologico di infezioni essudative dell'epidermide e di poliartriti settiche dei suini, lesioni cutanee di bovini ed equini, osteomieliti di volatili e bovini e occasionalmente di mastiti nei bovini (**Götz, 2006**).

S. delphini è stato implicato in lesioni cutanee purulente dei delfini (**Varaldo, 1988**).

S. schleiferi subsp. *coagulans* è associato al condotto uditivo esterno del cane (**Igimi, 1990**).

Sebbene le specie di stafilococchi coagulasi-negative costituiscano la componente principale della normale microflora umana, il loro ruolo (soprattutto quello di *S. epidermidis*) nel causare infezioni nosocomiali è stato riconosciuto e ben documentato negli ultimi vent'anni. Essi colonizzano la cute e le mucose umane, raggiungendo una densità negli ambienti umidi (cavità nasali, ascelle, aree perineale e inguinale) di 10^3 - 10^6 UFC/cm² e negli ambienti asciutti o alle estremità di 10 - 10^3 UFC/cm². Uno dei principali problemi dei laboratori è distinguere ceppi patogeni di CoNS, clinicamente significativi, da ceppi opportunisti. La maggior parte delle infezioni attribuite ai CoNS sono conseguenti all'ospedalizzazione. L'aumento di infezioni sostenute da questi microrganismi è stato correlato anche con il vasto utilizzo in campo medico di dispositivi protesici, cateteri endovenosi e all'aumento del numero dei pazienti immunocompromessi negli ospedali (ad esempio neonati prematuri, pazienti oncologici e pazienti sottoposti a trapianti). I processi infettivi possono essere il risultato della colonizzazione da parte di CoNS, che in genere hanno il ruolo di commensali o saprofiti, con il superamento delle normali barriere tegumentarie. Se l'apparato tegumentario viene danneggiato da traumi, se si verificano soluzioni di continuo a causa di aghi o corpi estranei, questi microrganismi possono invadere l'ospite. In relazione alla loro abilità di

1. GLI STAFILOCOCCI

aderire all'ospite o alla superficie di corpi estranei, di fare breccia o evitare la difesa del sistema immunitario e produrre un danno per l'ospite, questi batteri possono divenire patogeni (**Kloos, 1994**). *S. epidermidis* sembra avere il maggior potenziale patogeno e diversità adattativa. Questa specie è implicata in batteriemie, endocarditi a livello di valvole cardiache native e protesiche, osteomieliti, pioartriti, peritoniti durante dialisi continua ambulatoriale, mediastiniti, infezione di *pacemaker* permanenti, trapianti vascolari, *shunt* cerebrospinali, protesi articolari e vari dispositivi ortopedici, infezioni del tratto urinario tra cui cistiti, uretriti e pielonefriti. Ceppi nosocomiali di *S. epidermidis* meticillino-resistenti (MRSE) sono diventati un serio problema clinico dagli anni ottanta, soprattutto nei pazienti con valvole cardiache protesiche o sottoposti ad altre forme di chirurgia cardiaca. *S. epidermidis* è stato anche associato occasionalmente a mastite nei bovini.

Altre specie coagulasi-negative sono state associate a infezione sia nell'uomo sia negli animali. *S. haemolyticus* è la seconda specie di questo gruppo più frequentemente isolata in infezioni cliniche umane. È coinvolta in endocarditi valvolari, setticemie, peritoniti e infezioni del tratto urinario ed è occasionalmente associata a infezioni di ferite, ossa e articolazioni. *S. haemolyticus* è stato talvolta correlato a mastiti nel bovino.

S. caprae è ampiamente distribuito nei campioni clinici umani ed è stato implicato in casi di endocarditi infettive, batteriemie e infezioni del tratto urinario.

S. lugdunensis è responsabile di endocarditi delle valvole (native e protesiche), setticemie, ascessi cerebrali, osteoartriti croniche, infezioni dei tessuti molli e dell'osso, del liquido peritoneale e dei cateteri, soprattutto in pazienti con patologie sottostanti (**Götz, 2006**).

S. schleiferi è stato isolato in casi di empiema cerebrale, osteoartriti, batteriemia, infezione di ferite, infezioni associate a drenaggi cranici e cateteri giugulari. Questa specie è meno frequente di *S. lugdunensis* nell'ambiente ospedaliero e meno diffuso in infezioni umane. *S. saprophyticus* è un

1. GLI STAFILOCOCCI

importante patogeno opportunista nelle infezioni del tratto urinario, particolarmente in giovani donne sessualmente attive, nelle quali è considerata la seconda causa più comune di infezioni dell'apparato urinario come cistiti acute o pielonefriti. Può anche causare infezioni urinarie negli uomini nei quali, a differenza delle donne, si verificano più comunemente nell'età avanzata. *S. saprophyticus* è stato occasionalmente isolato da ferite infette e in casi di setticemie.

Diverse altre specie coagulasi-negative sono state coinvolte in misura minore in un'ampia varietà di infezioni umane. Nella maggior parte dei casi i pazienti con queste infezioni presentavano patologie predisponenti o sottostanti che avevano alterato il loro sistema immunitario, oppure erano stati sottoposti a chirurgia o manovre intravascolari.

S. warneri è stato riportato occasionalmente come l'agente eziologico di discospondiliti, endocarditi delle valvole native e infezioni del tratto urinario in donne e uomini. Questa specie è stata associata a mastite nel bovino.

S. simulans è stato associato a osteomieliti croniche umane, pioartriti e mastiti bovine. *S. felis*, correlato *S. simulans*, è stato isolato da casi di infezione in gatti, tra cui otiti esterne, cistiti, ascessi, ferite e altre infezioni cutanee.

S. capitis è stato implicato in casi di endocardite, setticemia e infezioni da catetere.

S. hominis è stato associato a endocarditi umane, peritoniti, setticemie ed artriti.

S. cohnii è stato associato ad infezioni del tratto urinario ed artriti.

S. chromogenes, strettamente correlato a *S. hyicus*, è comunemente isolato dal latte di vacche affette da mastite, sebbene il suo ruolo come agente eziologico sia discutibile.

S. sciuri è stato isolato da infezioni di ferite, cute e tessuti molli (**Götz, 2006**).

1. GLI STAFILOCOCCI

L'ampia distribuzione degli stafilococchi sulla superficie corporea di uomini e animali e le grandi dimensioni della loro popolazione complessiva rendono la raccolta di campioni una vera sfida; infatti, a meno di usare procedure attente e ponderate per isolare i microrganismi dal sito di infezione, è un lavoro difficile distinguere gli agenti eziologici dalla normale flora contaminante. La qualità del campione è largamente determinata da come viene raccolto e da quanto sia rappresentativo della patologia infettiva in atto (Kloos, 1994).

1.5 STAFILOCOCCI DI INTERESSE NELLA PATOLOGIA DEGLI ANIMALI DA COMPAGNIA

In base ad informazioni di carattere epidemiologico e patogenetico, relativamente poche specie di stafilococchi sono comunemente isolate dagli animali da compagnia, sia sani, sia in corso di malattia (Cox, 2008).

La maggior parte delle specie di *Staphylococcus* dimostra specificità d'ospite e alcune, come precedentemente accennato, presentano specificità di nicchia a livello del proprio ospite.

A tale proposito, uno studio condotto nel 2001 da Aarestrup, oltre ad indicare la specificità d'ospite di diversi ceppi di *S. pseudintermedius* isolati dalla cute di animali sani, traccia la teoria della co-evoluzione tra questo stafilococco e la specie animale ospite o, quanto meno, di un adattamento evolutivo dell'ospite, per quanto riguarda sei tra famiglie e sottofamiglie, all'interno della superfamiglia *Canoidea* (cani, lupi, volpi, orsi, panda rossi, procioni, tassi, donnole, puzzole, visoni, molfette). I risultati dello studio indicano, come già osservato da altri, una considerevole diversità genetica all'interno dei ceppi di *S. pseudintermedius* isolati e costituenti, per la maggior parte, la normale flora cutanea. E' stato anche osservato che i batteri isolati da ospiti della stessa

1. GLI STAFILOCOCCI

famiglia o sottofamiglia possono essere raggruppati insieme, ricalcando le relazioni filogenetiche degli animali ospiti e mostrando un'omologia anche superiore al 70%; ciò indica, appunto, co-evoluzione e un alto grado di specificità d'ospite. Le differenze riscontrate fra i genotipi dei diversi gruppi di stafilococchi sono basate sulla ribotipizzazione tramite EcoR1. Se le scoperte di tale studio potessero essere confermate mediante altri metodi e l'inclusione di un maggior numero di campioni, i ceppi di *S. pseudintermedius* potrebbero arrivare ad essere suddivisi in sottogruppi o sottospecie (**Aarestrup, 2001**).

Un altro lavoro basato sullo studio dell'rRNA 16S di ceppi di *S. pseudintermedius* isolati da cavalli, piccioni, visoni e cani ha mostrato elevata omologia del ribotipo tra i microrganismi provenienti dalle singole specie ospiti (soprattutto nei ceppi canini), rispetto all'omologia osservabile tra i diversi gruppi di ospiti in esame; comunque, il numero di ceppi esaminati era troppo basso per arrivare a conclusioni sicure (**Hesselbarth, 1995**).

Al di là del loro ruolo in qualità di commensali, per quanto concerne il significato clinico, gli stafilococchi coagulasi-positivi (*S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, per gli animali d'affezione) sono considerati come patogeni potenziali, responsabili anche di gravi infezioni. Sono quelli più frequentemente isolati dalle infezioni purulente del cane; sono implicati in numerose patologie, che possono colpire vari organi, ma quelle più comuni sono infezioni e ascessi a livello di cute, occhi, orecchie, apparato respiratorio, apparato urogenitale, scheletro e articolazioni. Altre lesioni associate nel cane ad infezione da parte di ceppi produttori di tossine, sono botriomicosi, sindrome della pelle ustionata, *shock* tossico e fascite necrotizzante (**Cox, 2008**).

Dai piccoli animali vengono isolate anche varie specie di stafilococchi coagulasi-negativi (come, ad esempio, *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. simulans*, ecc.). Comunque la maggior parte degli stafilococchi

1. GLI STAFILOCOCCI

coagulasi-negativi associati agli animali e all'uomo è rappresentata da patogeni opportunisti, che mancano di molti dei fattori di virulenza associati agli stafilococchi coagulasi-positivi.

1.5.1 *Staphylococcus intermedius*

Il suo primo isolamento dal cane risale al 1976 (**Hayek, 1976**); in precedenza gli isolamenti da animali di cocchi Gram-positivi con alcune caratteristiche come la produzione di coagulasi, di DNasi o di β -emolisina erano identificati con *S. aureus*, ma è probabile che buona parte dei ceppi fossero, in realtà, proprio *S. intermedius*, che non era ancora riconosciuto come specie separata (**Devriese, 2009**).

Nel 1999 Takahashi e colleghi hanno presentato uno studio filogenetico dei diversi ceppi di stafilococchi, nell'ambito del quale *S. intermedius* veniva messo in stretta relazione con *S. delphini* (**Takahashi, 1999**).

Già Hayek aveva rilevato un'inspiegabile eterogeneità fenotipica negli isolati di *S. intermedius*. Nel 2005 in Belgio questa ha trovato una spiegazione con l'identificazione di un gruppo di quattro ceppi con *pattern* elettroforetici simili, che differivano da quelli delle altre specie stafilococciche note. Il loro profilo era simile a quello di *S. intermedius* e *S. delphini*. Il gruppo era peculiare per il fatto che ognuno dei ceppi derivava da una diversa specie animale (1999: isolato da polmone di gatto; 1999: isolato da lesione cutanea di cavallo; 2001: isolato da orecchio con otite di cane; 2003: isolato da fegato di pappagallo). I ceppi isolati da questo studio sono stati identificati con una nuova specie di stafilococco, *S. pseudintermedius* (*pseudo* = falso, per via della elevata somiglianza fenotipica con *S. intermedius*) (**Devriese, 2005**).

1. GLI STAFILOCOCCI

Uno studio successivo ha identificato come *S. intermedius* solo i ceppi isolati dal piccione selvatico, come *S. delphini* alcuni ceppi isolati dal piccione domestico, dal cavallo e dal visone, mentre come *S. pseudintermedius* tutti i ceppi isolati dal cane e dal gatto, distinguendoli sulla base dell'analisi molecolare delle differenze in alcune sequenze dei geni *sodA* e *hsp60* (Sasaki, 2007). Questi tre stafilococchi sono stati raggruppati nel cosiddetto *Staphylococcus Intermedius Group* (SIG).

Dal 2009 si è stabilito di identificare come *S. pseudintermedius* tutti gli isolati di origine canina, a meno che non venga evidenziata l'appartenenza ad un'altra specie di stafilococco sulla base di un'indagine genetica (Devriese, 2009).

1.5.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

Presenta caratteristiche fenotipiche e colturali simili a *S. aureus*; cresce con colonie rotonde, convesse, a margini lisci, traslucide, grigio-biancastre, non pigmentate. Si sviluppa bene in terreni contenenti il 12% di cloruro di sodio e stentatamente quando la concentrazione del sale supera il 15%. E' coagulasi-positivo ma *clumping factor*-negativo; non elabora fibrinolisinasi, ma quote elevate di β - e δ -emolisina e, in alcuni casi, anche di α -emolisina, presentando, quindi, un doppio alone di emolisi. Normalmente, dopo 24 ore di incubazione si rileva un'ampia zona di emolisi beta, incompleta; dopo 48 ore è presente una sottile zona di emolisi alfa, completa addossata alla colonia. La resistenza alla penicillina e a numerosi altri antibiotici β -lattamici è dovuta alla produzione di penicillinasi. Produce una forte DNasi. È positivo ai test per acetoina, β -glucosidasi, arginina diidrolasi, ureasi, riduzione del nitrato, pirrolidonil arilamidasi e β -galattosidasi. Non produce β -glucuronidasi. Fermenta il glicerolo (debolmente), ribosio, galattosio, D-glucosio, D-

1. GLI STAFILOCOCCI

fruttosio, D-mannosio, mannitolo (debolmente), N-acetilglucosamina, maltosio, lattosio, saccarosio, trealosio e D-turanosio (debolmente) (**Devriese, 2009**).

Si riscontra comunemente sulla mucosa nasale e faringea, dove, in realtà, può essere considerato residente, e sulla cute, dove rappresenta il principale microrganismo saprofita, patogeno opportunista. Dopo la nascita i cuccioli acquisiscono la flora stafilococcica dalla madre nei primi giorni di vita. La cavità orale e la mucosa nasale sono le sedi prevalenti della colonizzazione, seguite dalla cute addominale e dalla mucosa anale. Il livello di colonizzazione della madre influenza quello dei cuccioli. Nei cani adulti, elevate concentrazioni batteriche di numerose specie di stafilococchi, tra cui *S. pseudintermedius*, risiedono a livello di sedi caratterizzate da elevata umidità, quali la mucosa nasale, anale e orale e in aree piuttosto chiuse, come gli spazi interdigitali e il canale auricolare. Popolazioni più limitate di *S. pseudintermedius*, ritrovate sulla superficie cutanea e sulla porzione distale del pelo, indicano una contaminazione o una colonizzazione transitoria, piuttosto che uno stato residente; le mucose rappresenterebbero la fonte di infezione cutanea e fungerebbero da *reservoir* di infezione nel cane (**Cox, 2008**).

Per quello che riguarda la patologia, i ceppi commensali di *S. pseudintermedius* sono in grado di causare malattia se è presente una concomitante alterazione dei normali meccanismi di difesa dell'ospite. *S. pseudintermedius* è la causa primaria di piodermite, superficiale e profonda, nel cane. Traumatismi o lesioni di natura varia (ferite, ectoparassiti, mancanza di igiene) favoriscono la colonizzazione secondaria; *S. pseudintermedius* invade gli strati superficiali e profondi, determinando lesioni quali impetigine, follicolite, foruncolosi, localizzate principalmente al muso e alla regione posteriore (**Martino, 2005**). L'invasione degli strati profondi può talvolta complicare le lesioni della rogna demodettica. E' da notare che, sebbene si conoscano molte cause sottostanti che predispongono gli animali alla piodermite, non si conosce, invece, quale sia il difetto specifico dell'ospite che consente allo stafilococco di proliferare (**Cox, 2008**).

1. GLI STAFILOCOCCI

Oltre che nella infezioni cutanee, *S. pseudintermedius* è anche la più comune specie stafilococcica isolata in corso di otite esterna, discospondilite, batteriemia, lesioni di palpebre e congiuntive, urolitiasi, ascessi e infezioni purulente di ferite; si riscontra anche in casi di endometrite o piometra, cistite, mastite e può determinare lesioni localizzate ad apparato respiratorio, ossa, articolazioni; è stato isolato anche da casi di endocarditi valvolari e pericarditi (Cox, 2008; Martino, 2005).

1.5.3 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

E' il principale stafilococco patogeno isolato nell'uomo, ma alcuni biotipi possono essere isolati da altri animali, tra cui il cane. E' così chiamato perché, generalmente, produce un pigmento giallo oro, ma la pigmentazione può variare dal giallo chiaro all'arancione scuro (Martino, 2005).

Si moltiplica in aerobiosi a 37°C, dando origine a colonie tipiche: pigmentate, lisce, lucenti, tondeggianti a margini netti. I ceppi capsulati (e spesso quelli meticillino-resistenti lo sono) formano, in genere, colonie più piccole e convesse, rispetto ai comuni ceppi privi di capsula. Le colonie possono esprimere differenti tipi di emolisi, in quanto vengono prodotte sia α , sia β -emolisine, spaziando da quella incompleta a quella completa e ad entrambe; eccezionalmente l'emolisi è assente. *S. aureus* fermenta mannitolo, saccarosio e ribosio, ma non cellobiosio e xilosio. E' coagulasi-positivo per eccellenza ed è dotato di *clumping factor*; produce proteasi, lipasi e fosfolipasi. La sua attività patogena è legata all'elaborazione delle tossine e degli enzimi descritti in precedenza e alla sensibilità dell'organismo animale o di singoli organi o apparati. Inoltre, condizioni estrinseche, alterando i meccanismi di protezione aspecifica (fagocitosi, integrità dei

1. GLI STAFILOCOCCI

tessuti di rivestimento), ne consentono la sopravvivenza e la colonizzazione in diversi distretti dell'organismo ospite (**Ruffo, 1998**).

Sebbene esistano varianti adattate ad altri ospiti (ruminanti, cavalli e suini), per quanto concerne il cane, la prevalenza di *S. aureus* è poco conosciuta, ma sembra comprendere meno del 10% dei ceppi isolati di animali normali e, apparentemente, questa specie non è saprofita residente, né sede-specifico in tali ospiti (**Cox, 2008**).

Viene considerato decisamente patogeno anche per gli animali, nei quali è responsabile di malattie a carattere sporadico, nei carnivori domestici e nell'equino, e di tipo endemico, negli animali da reddito, oltre che di infezioni suppurative, soprattutto conseguenti ad interventi chirurgici (**Ruffo, 1998**). L'infezione clinica, anche grave, si sviluppa solo in soggetti caratterizzati da determinati fattori di rischio, quali chirurgia, traumi, infezioni concomitanti, lesioni cutanee o immunocompromissione (**Weese, 2005**).

L'*habitat* più frequente è rappresentato, come visto, dalla mucosa nasale e dalla cute, ma le infezioni possono colpire anche organi e apparati diversi, soprattutto per l'attività delle tossine e degli enzimi prodotti; oltre ai quattro tipi di emolisine, infatti, è possibile che tossina esfoliativa, tossine neurotrophe e dermatrophe, TSST-1 e enterotossine facciano parte del corredo di prodotti patogeni di *S. aureus*.

Nel cane *S. aureus* è responsabile di varie dermatopatie (dermatiti localizzate e generalizzate). Di solito si comporta come germe di irruzione secondaria, che si moltiplica su lesioni superficiali di vario tipo ed è in grado di modificare l'ecosistema batterico cutaneo, dove diventa la specie predominante. Alterazioni cutanee e moltiplicazione batterica provocano lesioni e modificazioni istopatologiche, che danno origine a piodermite, cui fa seguito uno stato di ipersensibilità alle

1. GLI STAFILOCOCCI

infezioni batteriche. Il trattamento in questi casi deve essere in primo luogo diretto contro la causa primaria di lesione (**Ruffo, 1998**).

S. aureus interviene anche in forme di otite esterna, favorite dall'accumulo di materiale estraneo nell'area pretimpanica, da traumi, da inadeguata areazione o eccessiva presenza di peli nel meato esterno di alcune razze. Può essere isolato anche in casi di piometra nella cagna. In generale, causa condizioni suppurative simili a quelle causate da *S. pseudintermedius* (**Ruffo, 1998**).

1.5.4 *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

Si tratta di un'altra specie identificata nel cane, la cui prima descrizione risale al 1990 (**Igimi, 1990**).

Il batterio è stato isolato dal meato uditivo esterno di cani affetti da otite esterna; gli studi fenotipici lo hanno, inizialmente, messo in relazione con *S. pseudintermedius*, ma gli studi di ibridazione successivi hanno mostrato una parentela più stretta con *S. schleiferi*. Per questo motivo è stata creata questa sottospecie, che risulta principalmente patogena per il cane, ma che è stata isolata anche nell'uomo.

Le sue caratteristiche biochimiche e morfologiche di base sono di scarsa utilità nell'identificazione.

La presenza di emolisi è la prima caratteristica che dovrebbe condurre ad una più accurata valutazione biochimica, ai fini dell'identificazione. Anche *S. aureus* e *S. intermedius* presentano un alone di emolisi attorno alla colonia, ma, usualmente, producono sia α -, che β -emolisine, mostrando, quindi, un doppio alone, di emolisi completa e incompleta. Ciò non è comune nel caso di *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Questo batterio, inoltre, non esprime *clumping factor* e ciò, associato all'assenza di produzione di acidi da maltosio, trealosio e mannitolo, lo rende facilmente

1. GLI STAFILOCOCCI

differenziabile dai ceppi canini di *S. aureus*. Presenta, invece, grande somiglianza fenotipica e biochimica con *S. pseudintermedius*, dal quale è più difficilmente differenziabile.

Ad oggi questa specie viene solo raramente isolata dal meato uditivo esterno di cani affetti da otite esterna, sede che, peraltro, è *habitat* di vari microrganismi, tra cui giocano un ruolo fondamentale differenti specie di stafilococchi; i patogeni più importanti in questa sede sono proprio quelli coagulasi-positivi: in primo luogo *S. pseudintermedius*, seguito in misura minore da *S. aureus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. La scarsità dei ritrovamenti potrebbe risiedere proprio nella *mis*-identificazione con *S. pseudintermedius*. Una corretta procedura di identificazione dovrebbe favorire il rilevamento di un maggior numero di infezioni sostenute da *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, in cani, in altri animali domestici e anche nell'uomo, sia per capire meglio la situazione epidemiologica e le vie di diffusione del microrganismo, sia per instaurare una terapia antimicrobica adeguata, in quanto alcuni autori hanno già riportato casi di meticillino-resistenza da isolamenti canini. In letteratura sono state riportate anche segnalazioni di isolamento di questa specie da cani affetti da piodermite (Yamashita, 2005; Zdovc, 2004).

1.5.5 Stafilococchi coagulasi-negativi

Nonostante siano specie residenti, che contribuiscono anche ai normali meccanismi di difesa della cute, in determinate situazioni possono essere causa di patologia.

S. epidermidis è uno stafilococco coagulasi-negativo commensale di cute e mucose. E' dotato di un grande potenziale patogeno. Occasionalmente si può riscontrare su vari ospiti, probabilmente in seguito al trasferimento da fonte umana; è stato isolato dal cane in un caso di discospondilite, che è, però, un'infezione più comunemente causata da *S. pseudintermedius* (Cox, 2008). E' anche

1. GLI STAFILOCOCCI

comunemente presente a livello di meato uditivo esterno di cani sia sani, sia affetti da otite esterna, assieme a *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (Yamashita, 2005).

S. sciuri è ampiamente distribuito in natura ed è stato isolato dalle mucose nasali e orali del cane, oltre che dal mantello (Cox, 2008). Secondo alcuni Autori (Nagase, 2002), è lo stafilococco predominante (50%) isolato dalla cute di cani sani (solo il 40% dei soggetti esaminati presentava una colonizzazione da stafilococchi), assieme a *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. chromogenes* e *S. lentus* (ciascuno riscontrato nel 10% dei casi). In precedenza si è detto che *S. pseudintermedius* è lo stafilococco più spesso isolato nel cane e quanto appena riportato potrebbe sembrare in contrasto con questa affermazione, ma, in effetti, *S. pseudintermedius* viene più frequentemente isolato da altre sedi corporee, come le narici e la regione anale, e non dal mantello, quanto meno nei cani sani. *S. sciuri* sembra anche essere il serbatoio naturale dei geni della meticillino-resistenza, oltre che di quelli legati alla produzione delle stafilolisine (Gotz, 2006; Loeffler, 2005; Fuda, 2005).

S. schleiferi subsp. *schleiferi* è stato isolato dalla cute di cani con pododermite ricorrente (Cox, 2008).

Altre specie che, occasionalmente possono essere isolate dalla cute del cane, in quanto vanno a costituire popolazioni transienti di piccole dimensioni, sono *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* (Gotz, 2006).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

2.1 ASPETTI GENERALI

Uno dei maggiori progressi in campo medico nel ventesimo secolo è stato lo sviluppo di agenti antimicrobici sicuri ed efficaci. La scoperta più significativa è stata quella della penicillina G da parte di Fleming nel 1928 ed il successivo lavoro sulla benzilpenicillina di Florey e collaboratori negli anni quaranta (**Guardabassi, 2008**). Nel 1945 a Fleming, Florey e Chain è stato assegnato il premio Nobel per la Medicina.

Il pericolo dell'insorgenza dell'antibiotico-resistenza è stato prospettato sin dall'introduzione dell'uso degli antibiotici e da quel momento è stato in costante evoluzione.

Per antibiotico-resistenza si intende la capacità da parte dei batteri di sopravvivere e replicarsi in presenza di un farmaco antimicrobico; un batterio viene quindi considerato resistente nei confronti di un antibiotico se ha acquisito una caratteristica che lo ha reso capace di crescere in presenza di dosi terapeutiche dell'antibiotico. Dato che la resistenza antibiotica, una volta acquisita, viene trasmessa alle cellule figlie, essa corrisponde ad un'alterazione dell'informazione genetica cellulare (**Mazza, 1998**).

La resistenza agli agenti antimicrobici si è sviluppata molto tempo prima dell'introduzione degli antibiotici in medicina umana e veterinaria. Si è probabilmente originata milioni di anni fa ad opera di batteri antibiotico-produttori che vivevano nel suolo, ed è stata trasferita successivamente a specie batteriche di interesse medico. L'uso di agenti antimicrobici ha creato condizioni ottimali per l'emergenza e la disseminazione di ceppi batterici resistenti (**Guardabassi, 2008**).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Quella dell'antibiotico-resistenza è una problematica che merita particolare attenzione in quanto è stato documentato lo sviluppo di resistenza nei confronti della maggior parte, se non addirittura di tutti, gli agenti antimicrobici utilizzati in medicina umana e in ambito veterinario, e la proporzione di ceppi dotati di multiresistenza è significativamente aumentata per molti patogeni.

I fattori che possono favorire l'insorgenza dell'antibiotico-resistenza sono molteplici; l'uso inappropriato dei farmaci (auto-medicazioni, inadeguate dosi, tempi e vie di somministrazione) e/o il loro uso a scopo profilattico o come promotori di crescita sono solo alcuni degli aspetti che hanno portato a un aumento sempre maggiore dell'incidenza di questo fenomeno. Il continuo uso degli antibiotici e il loro accumulo progressivo nell'ambiente ha avuto come risultato l'aumento dei batteri resistenti a livello mondiale. Non va poi dimenticato un continuo aumento dell'età media, sia delle persone sia degli animali domestici, nonché un aumentato interesse per la salute di questi ultimi, con il risultato di un incremento nell'uso degli antibiotici. Sicuramente un ruolo fondamentale ha giocato anche la tendenza ad utilizzare antibiotici ad ampio spettro, talvolta per non rischiare di incorrere in fallimenti terapeutici, andando però a creare un circolo vizioso di nuovi trattamenti e di insorgenza di nuove resistenze batteriche. Con l'aumento della frequenza di utilizzo degli antibiotici, si è assistito di pari passo ad un aumento nella velocità di insorgenza della resistenza agli antibiotici, che si è tradotta nella progressiva perdita di efficacia degli stessi. Nell'ultima decade, l'insorgenza di ceppi multi-resistenti e i fallimenti nei trattamenti antibiotici delle infezioni batteriche hanno aumentato la consapevolezza generale verso la necessità di un uso più razionale dei farmaci.

L'osservazione del fatto che l'introduzione di un antibiotico nella clinica sia accompagnata, a breve, dallo sviluppo di batteri ad esso resistenti sottolinea la capacità di questi di rispondere velocemente alla pressione selettiva indotta dalla presenza di quella determinata sostanza.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

L'esposizione di una popolazione batterica ad un antibiotico determina una pressione selettiva che permette ai ceppi resistenti di aumentare la loro incidenza e di diventare così i cloni dominanti. Durante un trattamento antibiotico, tutti i batteri dell'organismo vengono sottoposti a questa pressione selettiva, anche quelli appartenenti alla normale flora microbica residente, soprattutto a livello digerente. Questo comporta la selezione e la sovracrescita dei ceppi resistenti con un importante *pool* genetico che possono funzionare come *reservoir*, in grado di trasferire la resistenza ad altri microrganismi presenti nell'organismo, sia a quelli appartenenti alla normale flora sia ad altri eventuali patogeni presenti. In molti casi, anche dopo la sospensione dell'uso dell'antibiotico, la popolazione resistente selezionata continua a persistere e di conseguenza persiste la resistenza all'antibiotico. Sicuramente non è in discussione il fatto che una terapia antibiotica, quando necessaria, sia indispensabile, e che l'effetto sulla flora microbica intestinale passi in secondo piano, ma per ovviare a questo fenomeno si dovrebbe mirare all'utilizzo di antibiotici con minimi effetti sui microrganismi residenti. Bisogna comunque sottolineare che l'espressione di geni di resistenza comporta dei costi metabolici per la cellula batterica; pertanto, in un contesto in cui l'espressione di questi determinanti di resistenza non costituisce un vantaggio, ossia in assenza della pressione selettiva da parte dell'antibiotico, la perdita di tali geni può risultare vantaggiosa. La presenza di elementi mobili, come plasmidi e trasposoni, può facilitare la perdita di resistenza nelle suddette condizioni, dal momento che questi elementi possono mediare, così come l'inserzione, anche il distacco di segmenti di DNA. La possibilità che si verifichi questa perdita in assenza di antibiotici rinforza ulteriormente l'importanza di un prudente uso delle sostanze antimicrobiche (**Ghezzi, 2011**). Un esempio è la perdita spontanea della meticillino-resistenza da parte di ceppi di MRSA durante il passaggio in terreni colturali privi di sostanze antibiotiche. Questi ceppi penicillinasi-produttori diventano sensibili alla meticillina se

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

vengono effettuate subcolture con almeno 20 passaggi in terreno privo di antibiotici ad una temperatura di 43°C (**Hiramatsu, 1990**).

D'altro canto, la considerazione che alcuni tipi di resistenza non compaiono in determinati generi nonostante l'elevata pressione antimicrobica, suggerisce che ci sia ancora molto da imparare riguardo allo sviluppo dell'antibiotico-resistenza. Ad esempio, la resistenza alle penicilline tramite la produzione di β -lattamasi non è mai stata documentata negli streptococchi; si può quindi desumere che gli streptococchi non siano in grado di "tollerare" i meccanismi di produzione delle β -lattamasi, che nello specifico coinvolgono sensori transmembrana e repressori citoplasmatici. Sicuramente gli ostacoli che portano alla mancata acquisizione di specifici determinanti di resistenza non sono dovuti ad una mancata introduzione di questi geni, dal momento che è stata chiaramente documentata in diversi generi la presenza di identici geni di resistenza e di trasposoni.

L'insorgenza di una resistenza clinicamente rilevante può comparire dopo tempo variabile, a distanza di qualche mese o di anni dall'introduzione di un nuovo farmaco sul mercato. Ad esempio, la resistenza alle penicilline è stata documentata pochi anni dopo la loro introduzione nella pratica clinica nel 1942, quella verso la streptomina un anno dopo la sua scoperta nel 1944. In rari casi, la resistenza può comparire dopo decenni, come nel caso della vancomicina, la cui efficacia è rimasta inalterata per ben 30 anni dalla sua introduzione sul mercato; questo caso eccezionale è probabilmente legato al fatto che, per i primi 25 anni dalla sua introduzione, la vancomicina ha comunque avuto un uso piuttosto limitato, data la grande disponibilità di altri antibiotici altrettanto efficaci durante l'"era degli antibiotici", tra gli anni cinquanta e sessanta. I primi ceppi vancomicina-resistenti sono così apparsi solo nel 1986, quando si è cominciato ad utilizzarla in tutti quei casi refrattari alle altre terapie antibiotiche (**Ghezzi, 2011**).

2.2 MECCANISMI DI SVILUPPO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA

La capacità di resistere ad un principio attivo può essere naturale o acquisita.

Per resistenza **naturale** o **intrinseca** si intende l'insensibilità costitutiva di un microrganismo verso un determinato principio attivo, e può dipendere da diversi fattori: meccanismo d'azione del farmaco, tipo di strutture di cui è dotato il microrganismo, mancato legame del farmaco con il sito bersaglio. Questo tipo di resistenza rappresenta una proprietà intrinseca di una determinata specie batterica; è quindi comune ai diversi ceppi di quella specie ed è caratterizzata dall'aver trasmissione verticale. Esempi di resistenza naturale sono i batteri Gram-negativi, prima tra tutti *Pseudomonas aeruginosa*, le cui membrane esterne molto poco permeabili fanno da barriera nei confronti della penetrazione di alcuni antibiotici (ad esempio i glicopeptidi), o gli streptomiceti che hanno geni responsabili della resistenza ai principi attivi da essi stessi prodotti, o ancora gli enterobatteri resistenti alla penicillina.

La resistenza **acquisita** è, invece, il risultato della spinta selettiva esercitata dalla presenza di un determinato antibiotico su una popolazione batterica, che porta alla selezione di un ceppo ad esso resistente. E' una resistenza intrinseca di un determinato ceppo e, a differenza di quella naturale, può essere trasmessa orizzontalmente, anche tra batteri di specie diverse, attraverso diversi meccanismi di scambio di materiale genetico. I geni implicati nell'antibiotico-resistenza nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi hanno dimostrato una identica sequenza, conducendo alla conclusione che il trasferimento è possibile anche tra batteri di generi diversi.

Le basi genetiche di questo importante fenomeno possono esser dovute all'acquisizione ed espressione di nuovo DNA che deriva da trasferimento genico orizzontale, come la trasduzione, la trasformazione e la coniugazione oppure a mutazioni in geni cellulari o geni acquisiti che alterano i siti bersaglio degli antimicrobici o influiscono sull'espressione genica. Si distinguono

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

principalmente due meccanismi: cromosomiali ed extracromosomiali (**Sabath, 1986; Saylers, 2002**).

Tra quelli di tipo **cromosomiale** rientrano le mutazioni spontanee, che si verificano tuttavia con una frequenza estremamente bassa in natura (10^{-9} - 10^{-10}) e non costituiscono pertanto il meccanismo più importante di resistenza. In genere la resistenza che si sviluppa in questo modo è rivolta verso un solo tipo di antibiotico, anche se esiste la possibilità di resistenze crociate nei confronti di altri farmaci con meccanismo d'azione sovrapponibile. Un esempio è rappresentato dai diversi enzimi (acetiltransferasi, adeniltransferasi, fosfotransferasi) coinvolti nell'inattivazione delle molecole di aminoglicosidi o di cloramfenicolo.

I meccanismi **extracromosomiali** sono molteplici, e la frequenza con cui si manifestano è nettamente superiore rispetto alle mutazioni. Caratteristica comune è la possibilità di trasferire la resistenza non solo tra microrganismi della stessa specie, ma anche tra batteri di specie diverse, soprattutto tra i Gram-negativi. Inoltre, a differenza delle mutazioni, la resistenza riguarda frequentemente più antibiotici, per cui si parla di resistenze multiple. Le similitudini tra i meccanismi di antibiotico-resistenza acquisiti e quelli presenti negli stessi batteri da cui vengono estratti gli antibiotici, suggeriscono che siano proprio questi ultimi il *pool* da cui sono originati i geni per l'antibiotico-resistenza. I geni di resistenza che questi batteri albergano come meccanismo di autodifesa sono generalmente contenuti nel DNA cromosomico, e inizialmente vengono trasmessi esclusivamente per via verticale; per il loro trasferimento ad altri batteri è pertanto necessario che essi vengano integrati in elementi genetici mobili, come plasmidi e trasposoni, in modo tale da permettere anche una trasmissione orizzontale. Come conseguenza, quando questi geni di resistenza vengono trasferiti tra differenti specie, e a volte generi, essi vanno incontro a mutazioni e modificazioni che li rendono ottimali per il nuovo microrganismo ospite, e che hanno come risultato la presenza di una varietà di determinanti, strutturalmente

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

eterogenei ma omologhi dal punto di vista funzionale. Un esempio di questa evoluzione divergente è la presenza di pompe di efflusso associate alla resistenza alle tetracicline nei batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

Inoltre, negli ultimi anni, i batteri hanno sviluppato resistenza anche nei confronti delle sostanze completamente sintetiche, non presenti in natura. Questa non è che un'ulteriore prova della straordinaria capacità dei microrganismi di far fronte alle variazioni delle condizioni ambientali, sviluppando una serie di metodi per sopravvivere anche in presenza di sostanze tossiche (**Schwarz, 2001**).

Come già detto, le modalità attraverso cui si realizza la diffusione dell'antibiotico-resistenza sono legate allo scambio di elementi genetici mobili, tra i quali rivestono un ruolo fondamentale i plasmidi, i trasposoni e gli integroni. Questi tre elementi sono composti da un doppio filamento di DNA, e differiscono tra loro per dimensioni, struttura, proprietà biologiche e via di diffusione.

I **plasmidi** sono piccole porzioni di materiale genetico extracromosomiale circolare, a doppio filamento, in grado di replicarsi autonomamente e permanere nella cellula batterica per diverse generazioni; possiedono infatti le informazioni genetiche necessarie per la loro stessa replicazione, assicurandosi quindi, durante la divisione batterica, la trasmissione di una copia del materiale genetico da loro veicolato ad ognuna delle due cellule figlie. Alcuni plasmidi possono anche integrarsi nel cromosoma batterico, prendendo in tal caso il nome di **episomi**; in queste condizioni la loro replicazione non è più autonoma, ma in sincronia con la replicazione batterica; in ogni caso, un episoma può separarsi dal cromosoma dopo l'avvenuta integrazione e ricominciare a replicarsi autonomamente sotto forma di plasmide. La loro presenza è stata riscontrata non solo in tutti i batteri di importanza medica, ma anche in quelli che costituiscono la normale flora microbica cutanea e mucosale dei mammiferi (**Schwarz, 2001**).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

I plasmidi possono avere dimensioni estremamente variabili (da 2 kbp a 100 kbp), ma, a differenza dei cromosomi, hanno dimensioni inferiori (da 1/20 a 1/100) e le informazioni genetiche da loro veicolate non sono essenziali alla sopravvivenza del microrganismo in condizioni fisiologiche, ma possono conferirgli caratteristiche vantaggiose in determinate circostanze, come ad esempio una maggiore virulenza o la capacità di metabolizzare sostanze diverse. Tra tutte, particolare importanza assume il trasferimento dell'antibiotico-resistenza, che avviene attraverso il fattore R, in grado di conferire ai batteri del genere *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Proteus* e *Shigella* resistenza multipla nei confronti di sulfamidici, tetraciclina, cloramfenicolo, streptomina, penicillina, kanamicina e altri antibiotici ancora. In casi particolari il fattore R trasmette contemporaneamente fattori di virulenza microbica, quali la capacità di produrre emolisine, enterotossine o le proprietà adesive. La pericolosità del trasferimento dell'antibiotico-resistenza è potenziata dalla possibilità di trasmissione anche tra batteri di specie e genere diversi; per cui esiste la possibilità che un batterio non patogeno, come ad esempio *Escherichia coli* (normale costituente della flora microbica intestinale di animali e uomo), in possesso del fattore R, trasferisca la resistenza agli antibiotici anche ad altri batteri Gram-negativi responsabili di patologia come *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia*.

Sono state descritte diverse classi di plasmidi che contribuiscono alla diffusione dell'antibiotico-resistenza:

- Plasmidi feromono-responsivi. Descritti per la prima volta in *Enterococcus faecalis*, codificano per la risposta a piccoli peptidi (feromoni) prodotti da altri enterococchi. Quando un batterio portatore di questo plasmide viene a contatto con un ceppo che produce feromoni, si scatena una cascata di eventi con conseguente produzione di una sostanza aggregante che porta le cellule ad ammassarsi, facilitando il trasferimento dei

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

plasmidi. Tuttavia il loro spettro di ospiti appare alquanto limitato e questo fenomeno è stato descritto principalmente per *E. faecalis*;

- Plasmidi di coniugazione non feromono-responsivi. Questo tipo di plasmidi è stato descritto in diversi tipi di batteri, principalmente batteri Gram-positivi; la frequenza di trasferimento è decisamente inferiore rispetto a quella dei plasmidi feromono-responsivi ma, a differenza dei precedenti, sono in grado di replicarsi in una larga varietà di specie batteriche
- Plasmidi mobilizzabili non-coniugativi. Questi plasmidi, descritti per primi in *S. aureus*, sono di dimensioni ridotte e contengono geni (*relaxase genes*) che permettono loro di essere mobilizzati da plasmidi più grandi; tuttavia, date le loro dimensioni ridotte, in genere trasferiscono uno o pochi geni di resistenza, attivi verso non più di un farmaco antimicrobico (**Rice, 2000**).

Un esempio importante è quello della resistenza mediante produzione di β -lattamasi che, essendo localizzata a livello di un plasmide di coniugazione, si sta diffondendo con elevata velocità tra le *Enterobacteriaceae* a livello mondiale.

Un altro tipo di elementi genetici mobili è rappresentato dai **trasposoni** o "*jumping genes*", sequenze di DNA lineare in grado di inserirsi e spostarsi in punti diversi del genoma nell'ambito della stessa cellula; questi elementi rappresentano un'importante fonte di variazione genetica, e sono, al tempo stesso, utili strumenti per l'ingegneria genomica e vettori in corso di terapia genica. Hanno dimensioni variabili, ma generalmente inferiori a quelle dei plasmidi (da 1 kbp a 60 kbp). I trasposoni di dimensioni più piccole, noti anche come "sequenze d'inserzione" (IS), portano solamente il gene che codifica per una transposasi, l'enzima responsabile del loro trasferimento. Quelli più grandi invece hanno un patrimonio genetico più ampio e spesso veicolano geni implicati

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

nella resistenza agli antibiotici e ad altre sostanze. Al contrario dei plasmidi, non sono in grado di replicarsi autonomamente ma, anzi, possono esistere solo come strutture inserite nel genoma, sia cromosomiale sia plasmidico, e possono trasferire i geni di resistenza da un cromosoma ad un plasmide e viceversa. Il meccanismo attraverso cui avviene questo scambio prende il nome di “trasposizione”. La scoperta della trasposizione nei batteri ha contribuito a chiarire meglio i meccanismi alla base della rapida diffusione dell’antibiotico-resistenza tra i batteri; l’estrema facilità con cui queste sequenze geniche si spostano all’interno del genoma batterico favorisce il loro inserimento nelle regioni di DNA che i batteri trasferiscono tra loro attraverso i meccanismi di coniugazione e trasduzione.

Due aspetti dei trasposoni sono particolarmente importanti per quanto riguarda il trasferimento di geni; il primo è che il loro trasferimento *in vitro* ha mostrato di essere stimolato dall’esposizione a determinate sostanze, come ad esempio alle tetracicline; in secondo luogo i trasposoni possono essere implicati nel trasferimento di *loci* non legati al cromosoma. Quindi l’utilizzo di certi antibiotici, come la tetraciclina, può stimolare il trasferimento dei determinanti di resistenza batterici, in aggiunta ai determinanti codificati dai trasposoni stessi.

I trasposoni possono essere distinti in diverse classi in base al loro meccanismo di trasposizione; quelli che utilizzano l’RNA appartengono alla classe I e sono chiamati retrotrasposoni, mentre quelli che utilizzano il DNA, e appartengono alla classe II, prendono il nome di DNA-trasposoni (Ghezzi, 2011).

Negli ultimi anni è stato scoperto un terzo meccanismo attraverso cui avviene il trasferimento dell’antibiotico-resistenza. Esso coinvolge gli **integroni**, piccoli elementi genetici (di dimensioni inferiori a 2kbp) costituiti da un gene codificante per un’integrasi (*intI*), affiancato da un promotore e un sito di ricombinazione (*attI*) in cui una o più cassette geniche mobili possono esser

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

inserite o escisse grazie ad un meccanismo di ricombinazione sito-specifico catalizzato dall'integrasi stessa. Le cassette geniche sono elementi costituiti da un singolo gene ed uno specifico sito di ricombinazione, *attC*. La maggior parte delle cassette geniche, che nella forma non integrata sono circolari, presenta determinanti per l'antibiotico-resistenza (ad esempio, codificano per enzimi che inattivano aminoglicosidi e β -lattamici) e non sembrano esistere limitazioni di specie alla loro diffusione.

Gli integroni differiscono dai plasmidi per l'assenza di un sistema di replicazione e dai trasposoni per l'assenza del sistema di trasposizione.

La presenza di integroni correlata con un fenotipo multiresistente è stata descritta in molte specie di batteri, prevalentemente Gram-negativi. In base al grado di omologia della sequenza del gene per l'integrasi, gli integroni vengono attualmente distinti in 4 classi; i più diffusi nei ceppi clinici sono quelli di classe 1, molti dei quali contengono il gene per la resistenza ai sulfamidici. Il fatto che integroni con ben nove geni di resistenza agli antibiotici (con una media di quattro o cinque) si trovino facilmente nella pratica clinica, anche in persone non esposte di recente agli antibiotici, lascia pensare che l'uso degli antibiotici negli ultimi cinquant'anni abbia arricchito il gruppo di cassette di resistenza nei batteri umani e animali, patogeni e commensali.

Anche se all'inizio si riteneva che gli integroni fossero limitati alla Famiglia delle *Enterobacteriaceae*, essi sono stati ritrovati anche in altri batteri come *Salmonella*, *Campylobacter*, enterococchi e stafilococchi (Ghezzi, 2011).

2.3 TRASFERIMENTO DI MATERIALE GENICO NEI BATTERI

Il procedimento attraverso cui avviene lo scambio di materiale genico nei batteri prende il nome di ricombinazione. Esso può avvenire tra il genoma di due cellule batteriche, oppure tra il genoma di una cellula batterica e il materiale genetico extracromosomiale (plasmidi, trasposoni).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Plasmidi e trasposoni vengono trasmessi verticalmente con la divisione della cellula batterica, ma possono anche essere trasferiti orizzontalmente tra batteri della stessa specie o di specie diversa tramite i processi di coniugazione, trasduzione, trasformazione e trasposizione. Non tutti i batteri sono in grado di utilizzare tutti questi meccanismi, ma molti di questi sono in grado di scambiare materiale genetico orizzontalmente attraverso almeno uno di essi (**Schwarz, 2001; Poli, 2005**).

Coniugazione

La coniugazione rappresenta il meccanismo con il quale più frequentemente si realizzano scambi genetici riguardanti la resistenza ai chemioantibiotici tra batteri di generi e specie differenti. Consiste nel trasferimento di un plasmide, definito plasmide di coniugazione, da una cellula donatrice ad una cellula ricevente. I plasmidi di coniugazione sono stati identificati sia nei batteri Gram-positivi sia nei Gram-negativi. La coniugazione è un evento abbastanza comune in natura, con una frequenza di 10^{-2} ; uno dei principali fattori necessari affinché la coniugazione sia efficace è lo stretto contatto tra le cellule. Perché una cellula batterica possa comportarsi come donatrice deve possedere un particolare elemento chiamato fattore F. Tali cellule sono perciò chiamate F+, mentre le cellule riceventi, prive del fattore F, sono chiamate F-. Il fattore F è rappresentato da una molecola circolare di DNA con struttura similcromosomica, contenente l'informazione genetica sufficiente per la propria replicazione. La trasmissione del fattore F da una cellula F+ ad una cellula F- si realizza grazie ad una particolare struttura posseduta solo dalle cellule F+ e chiamata pilo F o *sex pilus*. Si tratta di un'appendice filamentosa proteica che funziona da ponte tra due cellule coniuganti. Il fattore F può comportarsi come un plasmide vero e proprio, e cioè essere libero nel citoplasma e replicarsi indipendentemente dal cromosoma batterico, oppure può avere una localizzazione cromosomica, essere cioè integrato nel cromosoma batterico nella forma episomiale. Per questo motivo la coniugazione può avere due esiti diversi a seconda della

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

localizzazione del fattore F. Inoltre i plasmidi non-coniugativi di piccole dimensioni, che risiedono nella stessa cellula ospite, possono utilizzare questo apparato fornito dagli elementi coniugativi per trasferire sé stessi; questo processo prende il nome di **mobilizzazione** ed è, assieme alla coniugazione, uno dei principali meccanismi di trasferimento di resistenza tra batteri.

Nel caso in cui il fattore F sia libero nel citoplasma batterico, la cellula donatrice F⁺ è in grado di trasmetterlo con molta facilità alla cellula ricevente F⁻, che a sua volta diventa F⁺; il DNA si replica durante il trasferimento, con il risultato che ciascuna cellula ne possiede una copia e quindi la cellula ricevente diventa a sua volta donatrice; per questo motivo, una cellula F⁺ introdotta in una coltura di cellule F⁻ porta alla rapida conversione di tutte le cellule F⁻ a cellule F⁺. I donatori F⁺ non trasferiscono alcun gene cromosomico, ma solo il fattore F; se quest'ultimo contiene, oltre ai geni codificanti per la sintesi del *sex pilus*, anche altri geni, per esempio quelli che conferiscono antibiotico-resistenza (fattore R), il suo trasferimento comporterà la comparsa dei caratteri trasferiti nella cellula ricevente.

Le cellule batteriche in cui il fattore F è integrato nel cromosoma sono chiamate *Hfr* (*High Frequency of Recombination*) in quanto, a differenza dei donatori F⁺, le cellule *Hfr* donano frequentemente copie di geni del loro cromosoma. La duplicazione del cromosoma inizia in un sito del DNA adiacente all'integrazione del fattore F e il materiale viene trasmesso tramite il *sex pilus* dal donatore al ricevente finché le cellule non si separano. La coniugazione dura sempre meno di 90 minuti (tempo necessario al trasferimento dell'intera copia del cromosoma del donatore) e, poiché il fattore F è sempre l'ultima porzione ad essere trasferita, difficilmente le cellule riceventi diventeranno F⁺, e quindi non diventeranno a loro volta dei donatori. Nelle riceventi tuttavia, i nuovi geni provenienti dalla cellula *Hfr* si ricombinano con il cromosoma, portando alla comparsa dei caratteri genetici del donatore.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Esiste anche la possibilità che il fattore F integrato nel cromosoma delle cellule *Hfr* venga exciso e torni libero nel citoplasma, per cui tale batterio diventa F'; poiché durante tale processo possono avvenire degli errori, è possibile che geni batterici adiacenti al sito di integrazione del fattore F vengano incorporati durante la separazione. I geni cromosomici si replicano, quindi, insieme al fattore F quando questo viene trasferito ad una cellula ricevente, con il conseguente trasferimento dei geni associati (**Schwarz, 2001; Poli, 2005**).

Trasduzione

La trasduzione è un meccanismo di trasferimento genico con il quale un determinato carattere passa da un microrganismo ad un altro veicolato da un batteriofago, ovvero un virus in grado di infettare i batteri inserendovi il proprio DNA. Nella nuova cellula ospite, il virus può dirigere l'espressione dei propri geni, la replicazione e l'impacchettamento del DNA fagico dentro nuove particelle virali che vengono poi rilasciate dalla cellula batterica attraverso un ciclo litico. In altri casi il DNA fagico si integra nel DNA cromosomico della cellula ospite come profago, rimanendo localizzato per lunghi periodi in uno stato inattivo e solo in un secondo momento avviare il ciclo litico. Fattori esterni come, ad esempio, le radiazioni UV, possono favorire la riattivazione del profago e l'avvio del ciclo litico.

Durante la replicazione del batteriofago, tratti di DNA genomico o plasmidico della cellula batterica possono essere erroneamente inclusi nel capsido del virione, insieme al DNA fagico, quando il profago viene escisso dal DNA cromosomico; la particella virale ottenuta viene così definita "particella trasducente", in quanto in grado di trasferire il DNA estraneo ad una cellula batterica ricevente. Se il DNA trasdotto dal fago è cromosomico, può andare incontro a ricombinazione omologa ed essere stabilmente integrato ed espresso nel genoma della cellula batterica ricevente; se invece il DNA trasdotto è plasmidico, può essere replicato ed espresso

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

indipendentemente. In entrambi i casi, il trasferimento genico effettuato viene definito “trasduzione generalizzata”. In linea di principio, il frammento di DNA trasdotto può contenere qualunque gene del cromosoma batterico, in quanto una porzione casuale del genoma batterico viene impacchettata nel fago.

Esiste anche un altro tipo di trasduzione, la “trasduzione ristretta” o “specializzata”, tipica esclusivamente dei fagi cosiddetti temperati, ovvero quelli in grado di integrarsi e replicarsi stabilmente nel genoma batterico (profago). In seguito alla sua escissione dal cromosoma batterico, il fago può iniziare una sua replicazione indipendente e avviare il ciclo litico. Esiste la possibilità che l’escissione del profago non sia corretta, ma comporti l’asportazione di porzioni adiacenti del DNA batterico, che saranno trasportate passivamente in una nuova cellula infettata dal fago, integrandosi nel cromosoma e determinando quindi la comparsa nel batterio ricevente di caratteristiche tipiche del batterio donatore. Si parla di trasduzione ristretta per il fatto che normalmente i fagi temperati integrano il DNA in un preciso punto del cromosoma batterico per cui vengono generalmente trasdotte solo regioni di DNA adiacenti il sito di integrazione.

La diffusione dei geni di resistenza attraverso la trasduzione è fortemente influenzata da un limite legato alla quantità di DNA impacchettato nel fago e dalla necessità di specifici recettori per l’adsorbimento del fago stesso sulla superficie delle nuove cellule. Per gli stafilococchi, ad esempio, è stato osservato che 45 kbp è il limite massimo di DNA che può essere trasdotto. Dal momento che soltanto le cellule ospiti filogeneticamente vicine tra loro presentano gli stessi recettori di attacco del fago, la trasduzione si osserva comunemente tra i batteri della stessa specie e raramente avviene tra batteri di generi o specie differenti. Negli stafilococchi, dove manca la capacità di coniugazione a causa dell’assenza del fattore F, i plasmidi di resistenza possono essere trasmessi per trasduzione. Si ritiene infatti che la trasduzione sia uno tra i principali meccanismi di diffusione tra gli stafilococchi dei geni responsabili della resistenza agli antibiotici β -

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

lattamici, dato supportato dal fatto che la maggior parte dei plasmidi produttori di β -lattamasi ha una dimensione di 35-40 kb, all'incirca la dimensione del genoma di un batteriofago.

Il coinvolgimento della trasduzione nel trasferimento di altri determinanti di resistenza non è ben definita, mentre sono sicuramente implicati nella diffusione di alcuni determinanti di virulenza (**Schwarz, 2001; Poli, 2005**).

Trasformazione

La trasformazione è un meccanismo di trasferimento di DNA libero che si realizza attraverso l'assunzione, da parte di una cellula competente, di frammenti di DNA presenti nell'ambiente circostante, provenienti dalla lisi o dalla morte di un altro batterio. La cellula ricevente adsorbe tratti di DNA libero, che viene poi trasportato nel citoplasma, dove ricombina con un segmento omologo e può essere incorporato nel cromosoma del ricevente. Questo fenomeno comporta quindi l'acquisizione di caratteri ereditari nuovi da parte di una cellula batterica. Se invece il DNA non è correlato, l'assenza di omologia impedisce la ricombinazione e il DNA esogeno viene degradato. Si tratta della principale via di introduzione dei plasmidi all'interno di nuovi batteri utilizzata *in vitro*, mentre *in vivo* ha un ruolo limitato in quanto la maggior parte delle specie batteriche non è in grado di ricevere DNA esogeno dall'ambiente e, se lo acquisiscono, le nucleasi batteriche provvedono a degradarlo. Soltanto alcuni generi batterici come *Streptococcus*, *Bacillus*, *Haemophilus* e *Neisseria* sono "naturalmente competenti", ovvero hanno una capacità naturale di acquisire il DNA proveniente da specie correlate attraverso la parete cellulare.

La frequenza della trasformazione batterica spontanea è piuttosto rara in natura e sembrano scarse le implicazioni pratiche di questo processo di trasferimento genetico nella trasmissione della resistenza. Esiste tuttavia la possibilità che in animali infetti alcuni ceppi batterici trasformino i microrganismi della normale flora microbica in patogeni pericolosi.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Tra le specie patogene, quella che maggiormente utilizza questo meccanismo per l'acquisizione di geni di resistenza è *Streptococcus pneumoniae*; la resistenza alle penicilline in questa specie risulta infatti dalla captazione di geni che codificano per le *penicillin-binding proteins*, presumibilmente lasciati nell'ambiente da altri patogeni (**Schwarz, 2001; Poli, 2005**).

Trasposizione

Più recentemente è stato identificato un nuovo meccanismo di scambio genetico, definito trasposizione, mediante il quale può avvenire il trasporto e la diffusione di geni di resistenza. Tale sistema coinvolge i trasposoni, in grado di inserirsi all'interno del DNA batterico indipendentemente dalla ricombinazione, poiché non richiedono la presenza di DNA omologo. I trasposoni sono inoltre in grado di spostarsi anche tra i plasmidi, il che può spiegare, in parte, il progressivo sviluppo di fenotipi multiresistenti (**Schwarz, 2001; Poli, 2005**).

Come risultato dell'acquisizione della resistenza genotipica, indipendentemente dalla natura del meccanismo che l'ha determinata (mutazione, ricombinazione, ecc.), il microrganismo divenuto resistente esprime fenotipicamente uno o più caratteri o proprietà mediante i quali si realizza la resistenza stessa. Numerosi sono, infatti, i bersagli strutturali e funzionali la cui modificazione determina l'insensibilità del microrganismo all'azione del farmaco.

I principali meccanismi attraverso cui i microrganismi sviluppano antibiotico-resistenza sono tre:

- 1) impedito accumulo dell'antibiotico all'interno della cellula, sia attraverso la modificazione della permeabilità cellulare, sia tramite l'aumento dell'efflusso dell'antibiotico;
- 2) inattivazione enzimatica dell'antibiotico, tramite idrolisi o modificazione;
- 3) modificazione del sito d'attacco dell'antibiotico su una struttura "bersaglio" della cellula.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

1. Pompe d'efflusso

Un modo per impedire all'antibiotico di raggiungere il suo bersaglio è quello di impedirgli di raggiungere una concentrazione attiva all'interno della cellula. Questo scopo può essere raggiunto mediante due meccanismi: diminuirne l'ingresso all'interno della cellula, oppure aumentarne l'efflusso. La diminuzione dell'*uptake* del farmaco non è in genere mediata da geni di resistenza; in molti casi si tratta di resistenza intrinseca come, ad esempio, nel caso dei Gram-negativi, la cui membrana esterna risulta impermeabile a certi antibiotici. In genere il mancato ingresso del farmaco è dovuto a mutazioni che determinano una modificazione oppure una minor espressione, se non addirittura una perdita, delle proteine canale attraverso cui gli antibiotici entrano nella cellula batterica.

Per quanto riguarda invece l'aumento dell'efflusso del farmaco, esso è spesso legato alla presenza di pompe attive, i cui geni sono, nella maggior parte dei casi, di pertinenza plasmidica; queste pompe d'efflusso possono avere specificità per un singolo principio attivo, oppure, al contrario, essere in grado di trasportare numerose sostanze antimicrobiche. Dalla prima documentazione della presenza di resistenza alle tetracicline in *E. coli* attraverso pompe di efflusso transmembrana, questo meccanismo di resistenza è stato riconosciuto in numerosi altri batteri e verso molti dei principali farmaci utilizzati nella pratica clinica. L'importanza delle pompe di efflusso nei batteri Gram-negativi è emersa solo recentemente. *Pseudomonas aeruginosa* è tra i microrganismi che esemplifica al meglio questa condizione; i ceppi mutanti (resistenti) sono sprovvisti di un poro-canale della membrana esterna (OprD2) e presentano quindi una diminuzione nell'assorbimento di carbapenem, un antibiotico β -lattamico, impedendone il legame con il suo bersaglio, ovvero le PBP (*Penicillin Binding Proteins*). Un altro tipo di mutazione si traduce invece nell'*overespressione* di pompe di efflusso multiple (MexAB-OprM) attive cioè verso più di un antibiotico, rendendo i microrganismi resistenti ad un'ampia varietà di antimicrobici non strutturalmente correlati; dato

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

che la perdita della mutazione che coinvolge le pompe di efflusso MexAB-OprM risulta in una ipersensibilità nei confronti di vari antibiotici, si può dedurre che la resistenza di questi microrganismi è legata soprattutto all'azione delle suddette pompe di efflusso (**Schwarz, 2001**).

2. Inattivazione enzimatica degli antibiotici

L'inattivazione enzimatica degli antibiotici, sia mediante idrolisi sia grazie ad altre modificazioni strutturali, è uno dei maggiori meccanismi di resistenza dei patogeni nei confronti di antibiotici naturali come β -lattamici (penicilline e cefalosporine), aminoglicosidi e cloramfenicolo. Lo spettro d'azione di questi enzimi è generalmente limitato a un piccolo numero di composti strutturalmente correlati. L'esempio classico è l'idrolisi dell'anello β -lattamico delle penicilline e delle cefalosporine ad opera di enzimi idrolitici, le β -lattamasi, con l'ottenimento di molecole che non possono inibire il loro bersaglio, le PBP. Al contrario dei β -lattamici, gli aminoglicosidi non possiedono gruppi facilmente idrolizzabili; pertanto in questo caso l'inattivazione enzimatica consiste nella modificazione dei gruppi OH e NH₂ del farmaco. Lo stesso vale per il cloramfenicolo, che viene inattivato dall'enzima acetiltrasferasi, largamente distribuito tra i batteri patogeni di tutti i generi (**Schwarz, 2001**).

3. Modificazione del sito d'attacco

Al contrario degli antibiotici naturali, in cui la modificazione enzimatica è il principale meccanismo di resistenza, non sono stati scoperti enzimi in grado di idrolizzare o modificare gli antibiotici di sintesi come sulfamidici, trimetoprim e chinoloni. Per questi ultimi e per altri antibiotici naturali, come la rifampicina, l'antibiotico-resistenza viene raggiunta principalmente attraverso la modificazione del loro bersaglio. Tale modificazione può avvenire attraverso un'unica mutazione

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

(come nel caso della resistenza alla streptomicina) o con una serie di mutazioni successive (come avviene nella resistenza ai fluorochinoloni).

Il meccanismo principale attraverso cui i microrganismi sviluppano questo tipo di resistenza è l'acquisizione di nuovi geni, molto spesso veicolati da plasmidi o trasposoni. Un esempio è rappresentato dai batteri che sviluppano resistenza nei confronti dell'eritromicina; in questi microrganismi, il gruppo amminico di uno specifico residuo localizzato sul 23S rRNA viene mono- o di-metilato dall'enzima Erm (*Erythromycin ribosoma methylation*) metiltrasferasi, con lo sviluppo di resistenza crociata per macrolidi, lincosamidi e streptogramina B. Questa modificazione diminuisce l'affinità dell'antibiotico per l'rRNA, mentre non interferisce sulla sintesi proteica.

Anche la resistenza ai β -lattamici può svilupparsi, oltre che per il suddetto meccanismo di inattivazione enzimatica dell'antibiotico, per alterazione o mutazione delle PBP, rendendole meno affini ai β -lattamici, così come può avvenire tramite l'acquisizione di nuove PBP con bassa sensibilità all'antibiotico. Un esempio è *Streptococcus pneumoniae*, la cui resistenza ai β -lattamici è legata alla modificazione delle PBPs, a differenza della maggior parte dei patogeni che utilizza invece le β -lattamasi come principale meccanismo di resistenza (Schwarz, 2001).

2.4 RUOLO DEL *BIOFILM* NELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Un'altra struttura che può avere un ruolo importante nello sviluppo dell'antibiotico-resistenza è rappresentata dal *biofilm*. È stato ipotizzato che il *biofilm* sia la causa di circa il 65% delle infezioni batteriche. Si tratta di una particolare struttura prodotta da diverse specie batteriche che permette una solida adesione dei microrganismi alle superfici e la protezione nei confronti di agenti esterni (sistema immunitario, antibiotici, disinfettanti). È composto da prodotti del metabolismo degli stessi batteri, come esopolisaccaridi e proteine, unitamente a ioni e nutrienti sequestrati dall'ambiente esterno. Gli esopolisaccaridi mostrano due importanti funzioni: *in primis*

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

rappresentano una sorta di sostanza cementante, rinforzando i meccanismi primari di adesione dei batteri alle superfici; inoltre hanno una funzione protettiva nei confronti dei batteri, proteggendoli dall'essiccamento, dalla fagocitosi da parte dei leucociti e alterando la diffusione delle sostanze tossiche dall'ambiente esterno.

I batteri presenti nel *biofilm* mostrano caratteristiche differenti rispetto ai batteri "liberi"; infatti non si dividono frequentemente, presentano una morfologia diversa e anche il profilo di espressione genica è diverso rispetto alle altre cellule. Un esempio è l'inibizione della sintesi dei flagelli, che destabilizzerebbero il *biofilm* mentre, al contrario, si assiste alla produzione di esopolisaccaridi con funzione stabilizzante. Inoltre, è stato dimostrato attraverso diversi studi che i batteri che vivono nel *biofilm* sono in grado di acquisire elementi genetici trasmissibili molto più velocemente degli altri, ad esempio mediante la coniugazione. La resistenza del *biofilm* non è rivolta solo agli antibiotici, ma è stata dimostrata anche verso molti disinfettanti comunemente utilizzati, tra cui isotiazolone, composti dell'ammonio quaternario e agenti alogeni.

La resistenza di *Pseudomonas* spp. agli agenti antimicrobici ad esempio diventa molto più pronunciata quando questo microrganismo cresce all'interno di un *biofilm* (Gilbert, 1997; De Kievit, 2001).

2.5 CONTROLLO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA

L'utilizzo eccessivo ed inappropriato degli antibiotici rappresenta uno dei principali fattori alla base dello sviluppo e della diffusione dell'antibiotico-resistenza. In ambito veterinario questo può rappresentare un rischio anche per la salute umana, in quanto ceppi resistenti possono essere trasferiti all'uomo attraverso alimenti di origine animale o più complessi cicli ambientali. Inoltre, come detto in precedenza, microrganismi commensali possono svolgere il ruolo di *reservoir* di geni di antibiotico-resistenza trasmissibili ai patogeni. L'efficacia a lungo termine degli antibiotici può

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

essere garantita solo attraverso un loro prudente utilizzo; è opportuno selezionare una terapia antimicrobica mirata, utilizzando la più alta dose efficace tollerata per il più breve tempo possibile (più a lungo un paziente è sottoposto a trattamento antibiotico, più elevata è la probabilità di assistere allo sviluppo di microrganismi resistenti).

La potenziale comparsa di antibiotico-resistenza non deve tuttavia precludere l'utilizzo degli antibiotici in situazioni di necessità, ma lo sviluppo di resistenze deve essere sempre tenuto in considerazione come potenziale ed importante conseguenza del trattamento.

Una delle domande che molti autori si pongono è se la resistenza agli antibiotici possa scomparire o attenuarsi interrompendone o limitandone fortemente l'uso. A tutt'oggi le opinioni sono controverse, ma le prove a sostegno di questa ipotesi sono scarse, anzi alcuni recenti studi hanno avvalorato l'ipotesi contraria. Uno studio condotto in Gran Bretagna da Chiew e colleghi sulla resistenza delle *Enterobacteriaceae* alla streptomina ha mostrato come, nonostante il notevole calo dell'utilizzo di questo farmaco a partire da metà degli anni novanta, molti ceppi mostrino tuttora resistenza. Il caso della streptomina contribuisce quindi a smentire la diffusa idea che la resistenza verso un agente antimicrobico inutilizzato dovrebbe scomparire. È comunque vero che i determinanti per la resistenza alla streptomina appaiono, il più delle volte, strettamente legati a quelli per la resistenza verso i sulfamidici, tutt'oggi ampiamente utilizzati. Pertanto l'attenuazione della resistenza non è da escludere in assoluto, ma il presupposto necessario perché si manifesti è che i geni che determinano la resistenza verso un determinato farmaco non siano legati ad altri geni responsabili di resistenza verso altri farmaci o se, meno prevedibilmente, i geni di resistenza non sono associati con elementi genetici la cui versatilità serve a conservarli (**Chiew, 1998**).

La principale strategia adottata dalle case farmaceutiche per far fronte alla crescente diffusione dell'antibiotico-resistenza è stata quella di modificare gli antibiotici già esistenti, creando farmaci di seconda, terza e quarta generazione. Dal momento che i bersagli dei farmaci principali sono

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

abbastanza limitati, riassumibili in quattro gruppi (parete batterica, membrana citoplasmatica, sintesi proteica, sintesi di DNA/RNA), un modo per sviluppare nuovi farmaci potrebbe essere quello di ricercare nuovi bersagli. La base da cui partire per l'individuazione di questi nuovi bersagli è che essi siano essenziali per la crescita o la sopravvivenza dei batteri, e che siano espressi durante il processo infettivo. Al giorno d'oggi infatti ci sono i motivi per ritenere che i *pattern* espressi dai patogeni durante l'infezione possano essere differenti da quelli osservati in coltura. Infatti, gli studi tradizionali sull'intera cellula sono condotti *in vitro*, dove i batteri si trovano nelle condizioni ottimali per la loro crescita, e questo può portare a non riconoscere determinati sistemi che vengono indotti esclusivamente *in vivo* e sono rilevanti ai fini del processo infettivo.

Recentemente sono state messe a punto diverse tecniche che permettono di individuare e di monitorare l'espressione di alcuni geni *in vivo*; ad esempio la tecnica IVET (*In Vivo Expression Technique*) permette l'identificazione di quei geni che vengono specificatamente indotti in corso d'infezione. Una tecnica simile, la DFI (*Differential Fluorescence Induction*), identifica *in vivo* i promotori attraverso l'utilizzo di proteine fluorescenti; infine la STM (*Signature-tagged mutagenesis*), identifica i geni necessari per il processo infiammatorio (Yoneyama, 2006).

I più recenti studi sulla genomica batterica hanno scoperto nuovi possibili *target*, sicuramente ancora da indagare, tra cui spiccano:

- peptide deformilasi (PDF);
- vie metaboliche alternative a quelle del mevalonato;
- sintesi di acidi grassi;
- fattori di virulenza.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Peptide deformilasi (PDF)

Questa proteina sta assumendo sempre più interesse come nuovo bersaglio; infatti, benché le vie biochimiche di sintesi proteica mostrino numerose similitudini tra le cellule procariote ed eucariote, ci sono differenze sufficienti per permettere l'inibizione selettiva della sintesi proteica batterica. Una di queste differenze sta proprio nell'enzima PDF, non necessario alle cellule eucariote ma essenziale per la sintesi delle proteine batteriche. I nuovi farmaci che hanno come *target* questa proteina hanno dato risultati soddisfacenti, dimostrandosi attivi anche verso ceppi dotati di resistenza verso i principali antibiotici utilizzati (penicilline, cefalosporine, chinoloni e macrolidi). Pur essendo stata documentata la presenza di ceppi mutanti resistenti agli inibitori della PDF (*E. coli*, *S. aureus*, *H. influenzae*), in realtà questi ceppi hanno una crescita minore e una minore virulenza, e quindi questo tipo di resistenza non dovrebbe emergere in situazioni cliniche (Yoneyama, 2006).

Vie metaboliche alternative

Gli isoprenoidi, lipidi costituiti da unità ripetute di 5 atomi di carbonio (isoprene), sono strutture fondamentali per tutte le cellule, ma la loro via biosintetica differisce nelle cellule eucariote e procariote. Nelle cellule animali vengono infatti sintetizzati tramite una via metabolica che utilizza il mevalonato ("via del mevalonato"), mentre molti batteri, inclusi quelli di importanza clinica, utilizzano la "via del non-mevalonato" che è composta, in particolare, da sette enzimi, ognuno possibile *target* per lo sviluppo di nuovi farmaci (Yoneyama, 2006).

Sintesi degli acidi grassi

La biosintesi degli acidi grassi è essenziale per la crescita batterica; nelle cellule dei mammiferi la loro sintesi è catalizzata da un'unica grossa proteina, mentre nei batteri la via metabolica si

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

articola in una serie di passaggi successivi che coinvolgono diversi enzimi. Le differenze alla base dei due diversi sistemi possono rappresentare quindi il punto di partenza per lo sviluppo di farmaci antimicrobici mirati verso le sole cellule batteriche. Un esempio è rappresentato dal triclosan, un antimicrobico-antisettico recentemente sviluppato, che agisce bloccando l'enzima enoil-ACP reductasi, caratteristico delle cellule procariote (**Yoneyama, 2006**).

Fattori di virulenza batterici

I batteri patogeni producono *in vivo* sostanze che ne facilitano l'adesione, l'invasione e l'evasione delle difese dell'ospite; l'espressione di queste sostanze è soggetta a modulazione ed è condizionata dalle caratteristiche dell'ambiente che circonda il patogeno. Al blocco di uno di questi fattori di virulenza dovrebbe corrispondere quindi una diminuita virulenza del patogeno; dal momento che tali fattori sono peculiari delle cellule batteriche, sicuramente possono rappresentare il punto di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici (**Yoneyama, 2006**).

Un recente successo è stato ottenuto da Hergenrother e collaboratori dell'Università dell'Illinois, che ha scoperto che alcuni aminoglicosidi non utilizzati a scopo terapeutico sono in grado di eliminare gradualmente i plasmidi responsabili di resistenza da una linea cellulare. La ricerca di altre sostanze con questa stessa capacità potrebbe quindi essere un'interessante argomento di studio per far fronte alla crescente presenza di ceppi batterici multiresistenti (**Thomas, 2005**).

Va inoltre ricordato che il fenomeno della resistenza non è legato solamente al mondo batterico; infatti anche tra i miceti è presente il fenomeno della resistenza, come in *Candida albicans*, sin dall'introduzione di farmaci ad azione antifungina.

2.6 S. PSEUDINTERMEDIUS E RESISTENZA ANTIBIOTICA

Le basi genetiche dell'antibiotico-resistenza in *S. pseudintermedius* sono le più estesamente studiate tra i batteri isolati negli animali da compagnia. Piccoli plasmidi, che mediano la resistenza alle tetracicline attraverso *tet(K)*, ai macrolidi e lincosamidi con *erm(C)* e al cloramfenicolo con *catpC221*, sono stati rilevati in alcuni ceppi di *S. pseudintermedius* isolati da cani. Questi plasmidi sono strettamente correlati ad altri precedentemente descritti in altri stafilococchi di origine umana o animale che trasportavano *tet(K)*, *erm(C)* o *catpC221*.

La maggioranza dei ceppi di *S. pseudintermedius* acquisisce preferenzialmente geni di resistenza di origine trasposonica come il gene *tet(M)* della resistenza alle tetracicline che è dislocato sul trasposone coniugativo Tn916 e i geni della resistenza ai macrolidi/lincosamidi *erm(A)* o *erm(B)* localizzati rispettivamente sui trasposoni Tn554 e Tn917. Solo per la resistenza al cloramfenicolo sono più comunemente rilevati nei ceppi isolati nel gatto geni di origine plasmidica, che occasionalmente possono anche essere dislocati nel DNA cromosomale.

Sorprendentemente i ceppi di *S. pseudintermedius* del cane resistenti a tetracicline e macrolidi contengono geni di resistenza che prevalgono in enterococchi e streptococchi [ad esempio *tet(M)* e *erm(B)*] rispetto a quelli che si osservano in ceppi resistenti di *S. aureus* [ad esempio *tet(K)* e *erm(C)*], suggerendo che *S. pseudintermedius* potrebbe, di preferenza, acquisire geni dagli enterococchi. È stato recentemente proposto che elementi Tn540-simili associati con *erm(B)*, in ceppi di *S. pseudintermedius* del cane, possano derivare da enterococchi dal momento che elementi simili sono stati ritrovati su plasmidi enterococcici.

È stato inoltre dimostrato *in vitro* il trasferimento interspecifico dei geni plasmidici *aac(6')-aph(2'')* della resistenza agli aminoglicosidi da *Enterococcus faecalis* a *S. pseudintermedius*. Questi studi indicano che i ceppi di *S. pseudintermedius* sono in grado di acquisire geni di resistenza dagli

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

enterococchi, ma non si sa con certezza se essi siano capaci di trasmetterli ad altre specie batteriche (Guardabassi, 2004).

Il trasferimento del gene della meticillino-resistenza, *mecA*, tra specie diverse di stafilococchi è studiato approfonditamente (Archer, 1994) ed il suo passaggio da ceppi resistenti a ceppi sensibili è stato dimostrato anche *in vivo* (Wielders, 2001).

2.7 ANTIBIOTICI β -LATTAMICI

Con il termine di antibiotici β -lattamici si intendono quegli antibiotici la cui molecola è caratterizzata dalla presenza di un nucleo fondamentale comprendente un anello tetratomico azetidico β -lattamico.

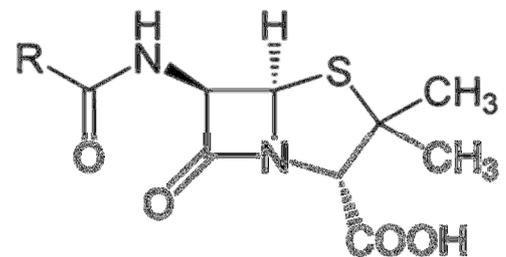
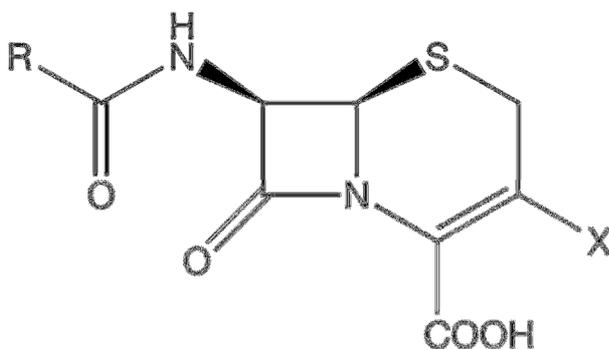


Fig. 2.7-1: Struttura della penicillina

Il primo gruppo di antibiotici β -lattamici è costituito dalle penicilline, scoperte nel 1928 dallo scozzese Alexander Fleming. Le penicilline sono sostanze antibatteriche isolate da prodotti del metabolismo di alcune specie di *Penicillium*, in particolare *Penicillium notatum* e *Penicillium*

Fig.2.7-2: Struttura dell'acido 7-aminocefalosporanico.



chrysogenum.

Sono composti β -lattamici, costituiti cioè da un anello β -lattamico, ovvero un'amide ciclica composta da tre atomi di carbonio e uno di azoto. Il nucleo fondamentale è rappresentato dall'acido 6-aminopenicillanico che può essere

considerato il risultato della fusione di due amminoacidi (L-cisteina e D-valina) in una struttura biciclica β -lattamico-tiazolidinica. L'ammina in posizione 6 può essere sostituita per ottenere i diversi composti della classe di antibiotici.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Il secondo gruppo è rappresentato dalle cefalosporine, ottenute nel 1945 dall'italiano Giuseppe Brotzu a partire da colture del fungo *Cephalosporium acremonium*. La loro struttura chimica è molto simile a quella delle penicilline; il loro nucleo fondamentale è rappresentato dall'acido 7-amino-cefalosporanico, che ha una struttura biciclica β -lattamico-diidrotiazinica (**Katzung, 1989**).

Gli antibiotici β -lattamici fanno parte del gruppo di sostanze antimicrobiche che inibiscono la sintesi del peptidoglicano della parete batterica. La parete dei batteri Gram-positivi è una struttura complessa, costituita, fondamentalmente, da glicoproteine. L'unità strutturale di base, che si ripete, è il peptidoglicano (o muramilpeptide), una macromolecola polisaccaridico-amminoacidica, formata dall'alternanza di due amminozuccheri (acido N-acetil-muramico e N-acetil-glucosamina) e da un pentapeptide collegato alle subunità di acido muramico (di solito costituito da L-alanina, acido D-glutammico, L-lisina e un dimero terminale di D-alanina). Le molecole lineari di peptidoglicano sono legate fra loro tramite legami crociati multipli, che si formano grazie all'interposizione di altre catene pentapeptidiche (in genere, pentaglicina) tra le catene amminoacidiche laterali. I ponti pentaglicinici si formano in seguito all'azione dell'enzima transpeptidasi, durante un processo biochimico detto transpeptidazione. Nella parete dei Gram-positivi si ritrovano circa 20 strati sovrapposti di peptidoglicano, tra le cui maglie è presente la matrice, costituita da polisaccaridi acidi, che prendono il nome di acidi teicoici.

L'azione di tutti i β -lattamici, prevede l'instaurarsi di un legame tra il farmaco e un recettore di membrana con funzioni enzimatiche, ovvero le già citate *Penicillin Binding Proteins* (PBP), che altro non sono se non transpeptidasi, coinvolte nella fase finale di sintesi della parete. Esistono numerose PBP, che si differenziano in base alla specie batterica considerata; ciascuna presenta specificità per un particolare antibiotico β -lattamico e la diversa affinità dei vari β -lattamici per differenti PBP può spiegare le differenze nello spettro di azione, ulteriormente influenzato, poi,

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

dall'eventuale presenza di β -lattamasi. Inoltre, su ogni cellula sono espresse molte PBP, anche appartenenti a diverse classi.

In tutti i β -lattamici una parte della molecola presenta somiglianza strutturale al dimero terminale delle catene pentapeptidiche, costituito, come detto, da D-alanina; questa è la porzione degli elementi costitutivi della parete che si lega all'enzima nel processo di transpeptidazione. Le penicilline si legano al sito attivo della transpeptidasi-PBP al posto dell'acil-D-alanil-D-alanina e vanno ad interferire con l'azione dell'enzima, inibendo il *cross-linkage* tra le catene lineari di peptidoglicano; si ha in questo modo un blocco irreversibile della sintesi della parete batterica. I legami crociati sono responsabili della rigidità della parete; quindi, le pareti difettose e osmoticamente instabili non sono in grado di sopportare l'elevata pressione endocellulare. Il blocco del processo di transpeptidazione è alla base della morte cellulare, che è di solito provocata da lisi, mediata anche da autolisine batteriche. Il *target* di questa classe antibiotica è quindi la parete cellulare in via di formazione ed essendo la sintesi di peptidoglicano attiva solo durante la fase di crescita batterica, i β -lattamici agiscono esclusivamente su microrganismi in attiva replicazione, non esercitando alcun effetto su batteri in fase stazionaria (**Colombo, 2007**). La lisi cellulare non è solo la conseguenza dell'arresto della sintesi del peptidoglicano prima del legame di transpeptidazione, con la produzione quindi di un tratto di peptidoglicano di struttura meno solida, ma anche il risultato dell'attivazione (innescata, attraverso una serie di complessi segnali di membrana, dal blocco nella sintesi peptidoglicanica) di uno o più enzimi in grado di depolimerizzare il peptidoglicano stesso (mureina-idrolasi). La presenza di tratti di peptidoglicano costruiti meno solidamente e l'attivazione della mureina-idrolasi provoca estese rotture nella componente fondamentale della parete cellulare, attraverso le quali il protoplasma batterico protrude, spinto dall'assunzione di acqua dall'esterno, non più controllabile, per andare incontro a lisi osmotica (**La Placa, 2008**).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Alla transpeptidazione partecipano numerosi enzimi (peptidoglicano-endopeptidasi, D-alanina-carbossipeptidasi, peptidoglicano-transpeptidasi) in grado di legare, con legame covalente, i β -lattamici (*penicillin-binding-proteins* o PBP), risultandone inattivati. Sembra quindi che i bersagli molecolari dei β -lattamici siano multipli, anche se tutti coinvolti nella sintesi del peptidoglicano.

Ogni β -lattamico ha un'affinità selettiva per una o più PBP e quindi il blocco della sintesi del peptidoglicano può interessare, a seconda del tipo di molecola, prevalentemente la formazione dei setti intercellulari o i vari punti di crescita alla periferia del batterio. Solo nel secondo caso si ha l'arresto nella crescita della cellula, mentre nel primo caso si ha solo un blocco nei processi di divisione del batterio che continua ad accrescersi oltre i limiti fisiologici (Colombo, 2007).

2.7.1 METICILLINA

La meticillina è una penicillina semi-sintetica, creata nel 1959 e introdotta nell'uso terapeutico nel 1960, in risposta alla "sfida" degli *S. aureus* β -lattamasi produttori. È il capostipite del gruppo delle penicilline penicillinasi-resistenti, caratterizzate dalla presenza nella loro molecola di una struttura ad anello legata al carbonio del gruppo carbonilico della catena laterale ammidica (Fig. 2.7-3).

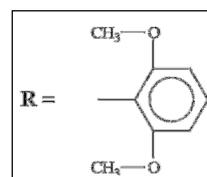
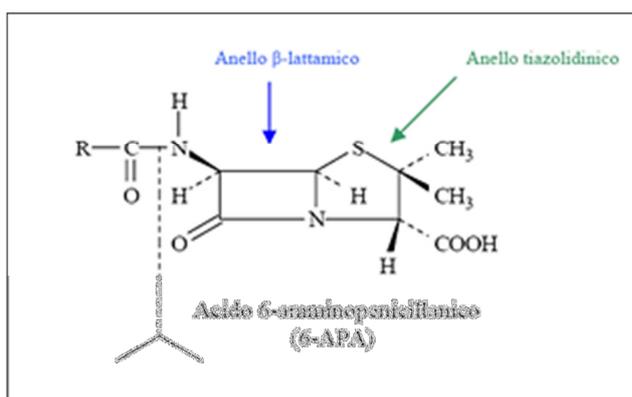


FIG. 2.7-3: Formula di struttura generale delle penicilline e struttura del radicale costituente la meticillina (riquadro).

Questi sostituenti sull'anello β -lattamico sono fondamentali per la resistenza, poiché esercitano un impedimento sterico all'accesso delle penicillinasi e proteggono dall'attacco di questi enzimi l'anello stesso, la cui integrità è essenziale per l'attività antimicrobica.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Altre penicilline penicillinasi-resistenti sono la nafcillina e le penicilline isossazoliche: oxacillina, cloxacillina, dicloxacillina e flucloxacillina. Sono tutte usate principalmente come antibiotici anti-stafilococcici; in particolare, dovrebbero essere utilizzate solo nelle infezioni sostenute da stafilococchi penicillinasi-produttori, che includono la maggior parte delle infezioni ospedaliere. Peraltro risultano meno attive delle penicilline naturali, se utilizzate contro microrganismi sensibili a queste ultime.

La meticillina è inattivata dall'acidità gastrica e per questo viene somministrata per via parenterale (endovenosa o intramuscolare, che a volte può causare una certa dolorabilità), sotto forma di sale sodico. Si distribuisce bene nella maggior parte dei tessuti altamente perfusi, nei fluidi corporei e nel tessuto osseo; inoltre, a differenza delle altre penicilline, è in grado di superare la barriera ematoencefalica, raggiungendo concentrazioni efficaci nel SNC. Viene eliminata con le urine. Anche la nafcillina ha scarsa disponibilità sistemica dopo somministrazione orale e per questo viene anch'essa somministrata per via parenterale. Viene eliminata per il 90% con la bile.

I derivati isossazolici resistono in ambiente gastrico e possono essere somministrati anche per via orale, con ragionevole assorbimento intestinale. In caso di infezioni gravi però, nonostante il buon assorbimento orale, è meglio la somministrazione parenterale, oltre ad un utilizzo in combinazione con altre molecole.

Le penicilline penicillinasi-resistenti sono caratterizzate da un elevato legame proteico che ne ritarda l'eliminazione e mantiene elevate le concentrazioni plasmatiche; questo però limita la penetrazione nei tessuti. Come tutte le penicilline, anche quelle penicillinasi-resistenti sono farmaci maneggevoli, caratterizzati da elevata tossicità selettiva ed effetti indesiderati trascurabili. Fra questi ultimi, in seguito a somministrazione orale, si possono riscontrare sintomi gastroenterici, quali anoressia, vomito o diarrea, imputabili ad alterazioni a carico della flora intestinale. I casi più preoccupanti però sono quelli caratterizzati da fenomeni di ipersensibilità; in

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

animali sensibilizzati può comparire una sintomatologia di gravità variabile, da reazioni di tipo orticarioide e *rush* cutanei, a reazioni acute, fino allo *shock* anafilattico. La somministrazione di nafcillina durante la chirurgia è stata ricollegata a casi di azotemia acuta *post-operatoria* nel cane, verificatasi entro 5 giorni dalla chirurgia.

Il meccanismo d'azione della meticillina è quello tipico di tutti i composti appartenenti alla famiglia delle β -lattamine. E' caratterizzata infatti da un'attività di tipo battericida; determina la morte dei batteri sensibili in seguito ad interferenza con la sintesi della parete cellulare e alterazione della sua integrità (La Placa, 2008; Mazza, 1998).

2.7.2 RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI β -LATTAMICI: *blaZ* e *mecA*

L'avvento della penicillina come agente chemioterapico negli anni quaranta ha migliorato in modo determinante la prognosi dei pazienti con infezioni da *S. aureus*, il cui livello di mortalità superava l'80%. Ma è stato un risultato di breve durata poiché in poco tempo sono stati selezionati ceppi di *S. aureus* penicillino-resistenti per via dell'espressione delle β -lattamasi. I primi ceppi di *S. aureus* penicillino-resistenti sono emersi negli ospedali attorno al 1942, con successiva proliferazione nel resto della popolazione. Dal 1950 più del 50% di tutti gli stafilococchi isolati era resistente alla penicillina (Fuda, 2005).

Il meccanismo centrale nella resistenza agli antibiotici β -lattamici consiste nella produzione di β -lattamasi, enzimi largamente diffusi sia tra i batteri Gram-positivi che tra quelli Gram-negativi; esse sono in grado di idrolizzare il legame amidico dell'anello β -lattamico delle penicilline e delle cefalosporine, con produzione di un derivato inattivo (La Placa, 2008).

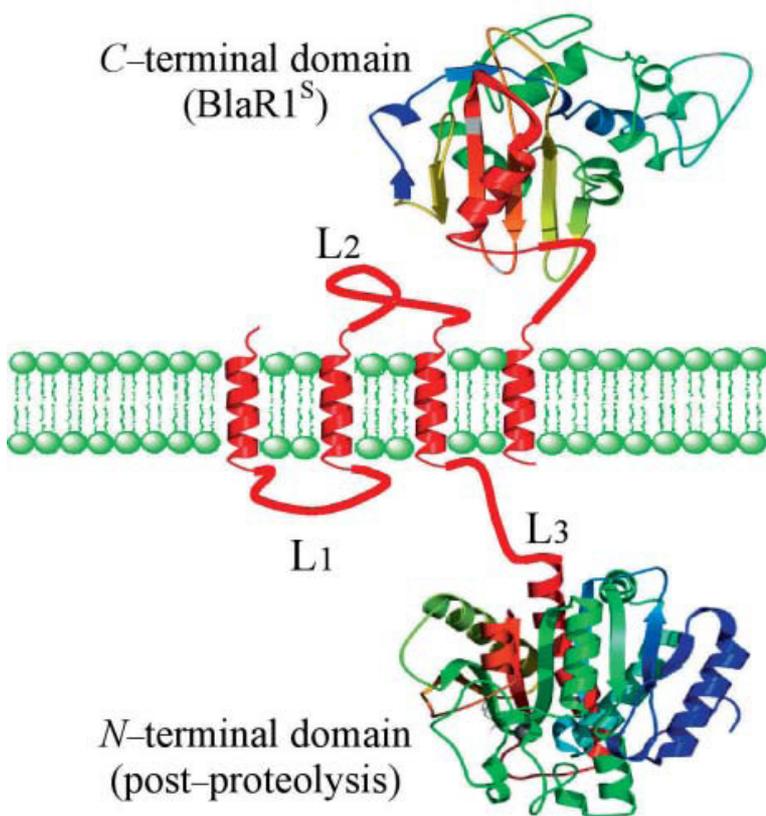
La produzione delle β -lattamasi è codificata dal gene *blaZ*, una sequenza plasmide-mediata. Un livello più elevato di resistenza ai β -lattamici (MRSA) è il risultato dell'acquisizione del gene *mecA*, che codifica per la *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a). Ceppi di stafilococchi che esibiscono una

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

resistenza legata alle β -lattamasi o alla PBP2a (o a entrambe) sono diventati un'importante presenza nel mondo dei patogeni umani. La resistenza β -lattamasi-dipendente è rilevabile attualmente in più del 95% degli stafilococchi isolati, mentre i ceppi di MRSA costituiscono il 25-50% degli isolati clinici in Nord America, Europa e Asia.

La trascrizione dei geni della β -lattamasi e della PBP2a è controllata rispettivamente dai sistemi regolatori BlaR-BlaI-BlaZ e MecR-MecI-MecA. I due sistemi sono estremamente simili per struttura e funzione, ma mantengono comunque un'identità distinta. Dei due il sistema regolatorio *bla* è

Fig. 2.7-4: Rappresentazione della struttura di BlaR1



meglio caratterizzato, poiché le conoscenze su di esso sono integrate da quelle sul sistema omologo appartenente a *Bacillus licheniformis*, un Gram-positivo non patogeno β -lattamasi-resistente. Si ritiene che il sistema *mec* sia equivalente a *bla* e quindi *bla* costituisce il modello di lavoro dei componenti regolatori di entrambi questi sistemi negli stafilococchi resistenti.

Il gene *blaZ* è localizzato su un elemento trasponibile di un grande plasmide. È collegato a due geni regolatori adiacenti, l'antirepressore *signal sensor/transducer blaR1* e il repressore *blaI*. Il prodotto dell'espressione del gene *blaZ* è la β -lattamasi stafilococcica di classe A PC1, che utilizza un sito attivo di serina per idrolizzare l'anello β -lattamico. L'espressione di questa β -lattamasi non è costitutiva, ma è indotta a seguito dell'incontro dello stafilococco (in possesso di plasmidi con

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

penicillinasi) con i β -lattamici. L'evento che dà inizio all'espressione della β -lattamasi è un'acilazione irreversibile, con la concomitante apertura del β -lattamico, di un sito attivo di serina nel dominio sensore della proteina della superficie cellulare BlaR1. Questa acilazione è il primo evento nella trasduzione del segnale. Il secondo evento è il clivaggio autoproteolitico zinco-dipendente a livello del dominio citoplasmatico di BlaR1/MecR1. L'autoclivaggio del trasduttore di segnale è seguito da una propagazione proteolitica, che si conclude con la proteolisi del repressore dimerico Blal. Questo si dissocia dal suo sito di legame permettendo la trascrizione di *blaZ/blaR/blal* (e nel caso di MecR *mecA/mecR/mecI*).

I trasduttori di segnale del sistema regolatore dell'espressione di β -lattamasi e PBP2a sono rispettivamente le proteine BlaR1 e MecR1. Sono entrambi recettori transmembrana. BlaR1 (**Fig. 2.7-4**) di *S. aureus* è una proteina ad alto peso molecolare legante le penicilline. È costituita da due domini: il primo è un dominio N-terminale di circa 38 kDa, con un' α -elica che attraversa la membrana quattro volte con quattro segmenti transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4), interconnessi da tre *loop* (L1, L2, L3), dove L1 e L3 sono sul versante citoplasmatico e L2 sul versante extracellulare. Il secondo dominio, di circa 27 kDa, è costituito da un sensore C-terminale della superficie plasmatica della membrana.

I β -lattamici nel *medium* extracellulare reagiscono con il sito attivo di serina del dominio C-terminale durante la reazione di acilazione. L'acilazione della serina da parte di un β -lattamico dà inizio a una cascata di segnale che esita nella derepressione del gene che codifica per le β -lattamasi. Sia il segmento citoplasmatico L3 che il segmento extracellulare L2 del dominio BlaR1 N-terminale sono ritenuti componenti essenziali della cascata del segnale. È stato suggerito che L3 regoli, in risposta all'acilazione del dominio C-terminale, l'attività autolitica del dominio N-terminale. Il *loop* L2 e BlaR1^S sono legati con legame non covalente e questa interazione è alterata dall'acilazione da parte dei β -lattamici. Si suppone che quest'attività proteolitica giochi un ruolo

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

fondamentale nella trasduzione del segnale, mentre la base dell'attivazione del meccanismo (che potrebbe verificarsi a seguito dell'alterazione conformazionale di L2 dopo l'acilazione della serina da parte dei β -lattamici) non è ancora nota con certezza.

La proteina MecR1 è omologa a BlaR1. Le somiglianze comprendono il meccanismo, le dimensioni e la sequenza (con un'identità del 43% dei domini sensore, del 33% dei domini proteasici e del 34% dell'intera lunghezza delle proteine). Nonostante questo non vi sono prove per supportare una sovrapposizione nella trasduzione del segnale: l'attivazione di BlaR1 dereprime solo il gene per l'espressione della β -lattamasi e quella di MecR1 soltanto il gene per l'espressione della PBP2a. L'attivazione di BlaR1 non esita nell'espressione della PBP2a, né viceversa l'attivazione di MecR1 nell'espressione della β -lattamasi. L'attuale conoscenza dell'attivazione di BlaR1 e della trasduzione del segnale è una cascata con un minimo di quattro eventi. Il primo è l'acilazione della serina nel dominio sensore; il secondo è l'alterazione della conformazione della proteina in risposta all'acilazione stabile della serina, correlata alla trasduzione del segnale transmembrana. Il terzo (e meglio compreso) evento è la propagazione intracitoplasmatica del segnale. Il quarto è il culmine del segnale che risulta nella derepressione del gene a seguito della proteolisi del repressore.

Un'ampia gamma di strutture di β -lattamici è in grado di acilare con successo il BlaR1 stafilococcico (Fuda, 2005).

Trasduzione del segnale

Il passaggio tra l'acilazione da parte del β -lattamico di BlaR1 e la derepressione finale dell'operone *bla* è la trasduzione del segnale. Dal momento che i β -lattamici non possono attraversare la membrana citoplasmatica si suppone che l'acilazione del sensore sia l'evento iniziale extracellulare. L'ipotesi attualmente avallata propone che la propagazione del segnale sia

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

mediata da un'alterazione nell'interazione non covalente tra il dominio sensore BlaR1^S e il *loop* extracellulare L2. Si ritiene che questa modificazione si propaghi attraverso le α -eliche transmembrana permettendo l'attivazione del dominio metalloproteasico citoplasmatico. L'alterata interazione tra BlaR1^S e L2 può quindi indurre un cambiamento conformazionale che pare essenziale per la trasduzione del segnale.

I sistemi *bla/mec* sono significativamente differenti da tutte le altre vie di trasduzione del segnale che utilizzano sistemi a due componenti chinasi dipendenti. Vi sono diverse ipotesi sulla modalità di trasduzione del segnale in BlaR1. Una proposta considera una modificata conformazione delle proteine integrali di membrana, le cui α -eliche transmembrana sono coinvolte in un riallineamento. Comunque manca la diretta evidenza di un cambiamento nella regione transmembrana dopo acilazione. Una seconda ipotesi sulla trasduzione del segnale è il clivaggio proteolitico dei componenti del segnale. Questo meccanismo è sostenuto dall'evidenza dell'autoclivaggio della metalloproteasi citoplasmatica sull'*N*-terminale di BlaR1 (Fuda, 2005).

Clivaggio del repressore

Gli ultimi passaggi per l'espressione della β -lattamasi (e PBP2a) sono molto simili. Le metalloproteasi intracellulari, attivate dall'acilazione del dominio sensore, determinano il clivaggio dei repressori proteici dimerici, separandoli dalla sequenza del repressore e permettendo la trascrizione di *blaZ* o *mecA*. La deregolazione quindi coinvolge tre eventi: il clivaggio del repressore che blocca la trascrizione del gene, la divergente trascrizione dei geni che codificano per le proteine regolate e le proteine regolatrici correlate e la rirepressione del gene (una volta venuta a mancare la presenza dei β -lattamici nel *medium* extracellulare).

L'operone che codifica per la proteina regolata (β -lattamasi o PBP2a) e per le proteine regolatrici (Blal/BlaR1 o MecI/MecR1) si sovrappone parzialmente alla regione operatrice a cui si lega il

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

repressore. Il legame del repressore al sistema *bla* esita in una repressione di *blaZ*, *blaR1* e *blaI*, oltre alla repressione della regione regolatrice. Quindi la rimozione del repressore ha come risultato che entrambe le serie di geni vengono trascritte con la contemporanea espressione del repressore e del trasduttore di segnale della β -lattamasi (o PBP2a). I repressori limitano la trascrizione legando due specifiche regioni palindromiche nell'operatore *bla* (o *mec*), chiamate Z e R1, nella regione intergenica tra il gene *blaZ* (o *mecA*) e gli operoni regolatori di *blaR1-blaI* (o *mecR1-mecI*). Il clivaggio di *BlaI* dissocia il dimero. Lo spiazzamento del repressore dal suo sito intergenico permette la trascrizione di *blaZ*. Presumendo che *BlaR1* attivi la trasduzione del segnale una volta sola, deve continuamente essere prodotto per rilevare la concentrazione ambientale di β -lattamico. *BlaI*, *BlaR1* (inclusa presumibilmente la metalloproteasi) e la β -lattamasi sono tutte espresse. *BlaI* aumenta la propria concentrazione citoplasmatica di circa cinque volte a seguito della stimolazione da parte della penicillina. Quando diminuisce la concentrazione extracellulare di β -lattamico, *BlaR1* non si autoattiva più. Il clivaggio proteolitico di *MecI/BlaI* termina e la concentrazione del repressore aumenta. Il repressore dimerizza, lega il DNA e inibisce di nuovo la sintesi di *mecA* e *blaZ*.

2.7.3 METICILLINO-RESISTENZA

Il primo ceppo di *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) ha fatto la sua comparsa nel 1961 (**Jevons, 1961**), un anno dopo l'introduzione dell'uso della meticillina in terapia; successivamente i ceppi MRSA si sono diffusi fino a diventare un problema di livello mondiale.

Diversi geni cromosomici intervengono influenzando l'espressione fenotipica della meticillino-resistenza, conferendo livelli maggiori o minori di resistenza allo stafilococco. Questi geni sono elencati nella tabella 2.7-1.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Gene (alternate names)	Function or effects on methicillin resistance levels	References
<i>fmhB</i> (<i>femX</i>)	Interpeptide formation; addition of the first glycine to the stem peptide; inactivation lethal	(Rohrer et al. 1999)
<i>femA</i>	Interpeptide formation; addition of the 2nd and 3rd glycine to the stem peptide; inactivation abolishes methicillin resistance	(Strandén et al. 1997)
<i>femB</i>	Interpeptide formation addition of the 4th and 5th glycine to the stem peptide; inactivation reduces methicillin resistance	(Henze et al. 1993)
<i>femC</i> (<i>glnR</i>)	Glutamine synthetase repressor; inactivation reduces amidation of the iD-glutamate of the stempeptide; inactivation reduces methicillin resistance	(Gustafson et al. 1994)
<i>femD</i> (<i>femR315</i>) (<i>glmM</i>)	Phosphoglucosamine mutase; catalyzes the interconversion of glucosamine-6-phosphate to glucosamine-1-phosphate; a cytoplasmic peptidoglycan precursor; inactivation reduces methicillin resistance	(Jolly et al. 1997)
<i>femE</i>	Function unknown; inactivation slightly reduces methicillin resistance	(de Lencastre et al. 1994)
<i>femF</i> (<i>murE</i>)	Catalyzes incorporation of lysine into peptidoglycan stem peptide; inactivation reduces methicillin resistance	(Ornelas-Soares et al. 1994)
<i>fntA</i>	Membrane protein; inactivation decreases cross-linking and amidation of peptidoglycan, and reduces methicillin resistance	(Komatsuzawa et al. 1999)
<i>fntB</i> (<i>mvp</i>)	Cell surface protein; function unknown; inactivation reduces pentaglycyl-substituted monomer of the cell wall fraction while increasing the amount of unsubstituted pentapeptide and reduces methicillin resistance	(Wu and De Lencastre 1999; Komatsuzawa et al. 2000)
<i>fntC</i> (<i>mvpF</i>)	Membrane-associated protein; inactivation reduces modification of phosphatidyl-glycerol with L-lysine, and reduces methicillin resistance	(Komatsuzawa et al. 2001; Peschel et al. 2001)
<i>llm</i>	Function unknown; inactivation increases Triton-X-100-induced autolysis and reduces resistance	(Maki et al. 1994)
<i>lytH</i>	Homologous to lytic enzymes; inactivation increases methicillin resistance	(Fujimura and Murakami 1997)
<i>pbp2</i>	Penicillin-binding protein 2; functional transglycosylase domain of PBP2 is needed for methicillin resistance	(Pinho et al. 2001a)
<i>sigB</i>	Alternate transcription factor; inactivation reduces methicillin resistance	(Wu et al. 1996)
<i>hmrA</i>	Putative aminohydrolase; overexpression increases methicillin resistance	(Kondo et al. 2001)
<i>hmrB</i>	Homologue of acyl carrier protein; overexpression increases methicillin resistance	(Kondo et al. 2001)
<i>dlt</i> operon	Transfer of D-alanine into teichoic acids; inactivation increases methicillin resistance	(Nakao et al. 2000)

Tab. 2.7-1: Geni cromosomici che influenzano il livello di meticillino-resistenza (Berger-Bächli, 2002).

Di nostro interesse è in particolare il gene *mecA*, il gene specifico della meticillino-resistenza. Sebbene ci siano alcune differenze tutti i cloni di MRSA possiedono il gene *mecA*, spesso accompagnato dai suoi geni regolatori *mecR1-mecI*. Sono tutti localizzati su un'isola genomica mobile detta cassetta cromosomica stafilococcica *mec* (SCC*mec*, di circa 21-67 kb). Questa cassetta cromosomica unisce l'intero operone *mec* (circa 28kb) al gene *ccr*, un complesso che codifica per delle ricombinasi sito-specifiche responsabili della mobilità di SCC*mec*. Questa mobilità è essenziale per la resistenza, poiché ceppi di *S. aureus* meticillino-sensibili (MSSA) devono acquisire SCC*mec* da ceppi di MRSA. Nonostante SCC*mec* sia stato trovato in molte specie stafilococciche, si sa poco sulla sua origine. Un *pattern* che presenta un codone atipico ed il contenuto di GC suggerisce l'acquisizione da altre specie batteriche. La possibilità più probabile è una PBP derivante da *Staphylococcus sciuri*, una specie considerata tassonomicamente primitiva tra gli

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

stafilococchi ed isolata principalmente da roditori e piccoli mammiferi. Sebbene la PBP di *S. sciuri* abbia un'omologia dell'88% di amminoacidi con PBP2a, non è provata una relazione certa. È sicura invece la trasmissione orizzontale di SCCmec tra le specie di stafilococchi all'interno del proprio genere, portando ad una significativa disseminazione clonale (Fuda, 2005).

È stato riportato il rilevamento di cinque tipi di SCCmec legati ad antibiotico resistenza e di quattro SCC non-mec. Sia SCCmec che SCC non-mec sono stati classificati e caratterizzati in accordo con i relativi geni della ricombinasi della cassetta cromosomica (*ccr*) e soprattutto con la composizione genetica. SCC è un veicolo ben sviluppato per lo scambio di geni tra le specie stafilococciche e potrebbe essere utile per le cellule che vivano in ambienti ricchi di fonti di stress.

L'integrazione dell'elemento è sequenza-specifico, a livello di un unico sito (*bacterial chromosomal attachment site, attBsc*) localizzato vicino all'origine della replicazione di *S. aureus* (accanto a *pur* e *spa*). *attBsc* è a valle di una *open reading frame* (ORF) di funzione sconosciuta, denominato *orfX*, che è ben conservato tra i ceppi clinici di *S. aureus*. *orfX* è presente sia nei ceppi resistenti che in quelli sensibili alla meticillina. *attBSCC* contiene una sequenza di 15 bp che, quando SCCmec è integrato nel cromosoma, è rilevabile a livello di entrambe le giunzioni tra il cromosoma e SCCmec. Una delle due sequenze ripetute è localizzata all'interno di SCCmec, al terminale destro. Sequenze invertite incomplete sono presenti ad entrambi i terminali di SCCmec. Pare che queste sequenze ripetute siano riconosciute da ricombinasi specifiche per SCCmec durante l'integrazione e l'escissione di SCCmec in e dal cromosoma. Per lo spostamento SCCmec ha dei geni specifici (*ccr*), che codificano per ricombinasi della famiglia delle invertasi/resolvasi. Sono state riportate quattro paia di omologhi di geni *ccrAB* ed un *ccrC*. La porzione catalitica di Ccr, a livello del dominio N-terminale è caratteristica delle ricombinasi della famiglia delle invertasi/resolvasi, e il residuo catalitico di serina del sito attivo di ricombinazione è conservato in tutte le proteine Ccr. Le ricombinasi sito-specifiche di altri generi batterici sono correlate, anche se con grande distanza,

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

con le sottofamiglie conosciute di *ccr*, ma la loro modalità di azione resta da definirsi. I tipi conosciuti di *CcrAB* e *CcrC* sono correlati ad un'integrasi sito-specifica del batteriofago TP901-1 di *Lactococcus lactis*, ad una ricombinasi sito-specifica *SpoIVCA* di *Bacillus subtilis* e ad una trasposasi *TnpXX* di *Clostridium perfringens*.

SCC non contiene alcun gene codificante per proteine della *testa* o della *coda* di batteriofagi e non possiede il gene *tra*, necessario per il trasferimento per coniugazione. In aggiunta ai geni *ccr* e *mec*, SCC contiene uno o più geni di resistenza antibiotica, che sono trasportati su vari trasposoni e copie integrate di plasmidi (Fuda, 2005).

2.7.3 A SCC*mec* I-V

Sono stati identificati cinque tipi diversi di SCC*mec* (I-V), definiti dalla specifica combinazione di due parti: il complesso *ccr* e il complesso *mec*. I cinque allotipi del complesso *ccr* sono stati denominati *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* e *ccrC*. Sono state descritte cinque classi del complesso *mec* (A-E).

I differenti tipi di SCC*mec* sono chiamati SCC*mec* di tipo I (complesso di classe B del gene *mec* e *ccrAB* di tipo 1); SCC*mec* di tipo II (complesso di classe A del gene *mec* e *ccrAB* di tipo 2), SCC*mec* di tipo III (complesso di classe A del gene *mec* e *ccrAB* di tipo 3); SCC*mec* di tipo IV (complesso di classe B del gene *mec* e *ccrAB* di tipo 2) e SCC*mec* di tipo V (complesso di classe C2 del gene *mec* e *ccrC*). La restante parte di SCC*mec*, accanto a *ccr* e *mec*, è chiamata regione J (J per *Junkyard*), riferendosi al fatto che questa è costituita da componenti non essenziali di SCC*mec*. Le varianti di ciascun SCC*mec* sono definite dalle differenze nelle regioni J. SCC*mec* di tipo IV è stato suddiviso nei sottotipi SCC*mec* IVa, SCC*mec* IVb e SCC*mec* IVc, sulla base delle differenze nella regione J. È stato descritto anche un sottotipo SCC*mec* IVd.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

È stato sviluppato metodo di PCR *simplex* per il rilevamento dei complessi *ccr* e *mec*, oltre alla regione J. Per l'identificazione rapida dei tipi strutturali e delle varianti degli elementi *mec* negli MRSA è stata elaborata una PCR *multiplex*. Con questo metodo si possono rilevare le differenze tra le varianti. Recentemente sono state riportate sette nuove varianti di SCC*mec* di tipo II e IV: SCC*mec* IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IVE e IVF. In aggiunta è stata trovata una variante di SCC*mec* I mancante del gene *pls*.

SCC*mec* di tipo I, IV e V non contengono alcun gene di antibiotico resistenza, con l'eccezione di *mecA*, ma SCC*mec* di sottotipo IVc trasporta Tn4001, codificante per la proteina bifunzionale AAC/APH (*aacA-aphD*), che conferisce resistenza alla maggior parte degli aminoglicosidi, tranne all'arbekacina. SCC*mec* di tipo II trasporta Tn554 che codifica per la resistenza all'eritromicina (*ermA*) e alla spectinomicina (*spc*). pUB110 è affiancato da una coppia di elementi IS431 e codifica per la resistenza a kanamicina e tobramicina (*aadD*)/bleomicina (*ble*). SCC*mec* di tipo III contiene Tn554 (resistenza ai macrolidi), uno pseudo cTn554, che codifica per la resistenza al cadmio (*cad*), pUB110, una copia integrata di pT181 (*tetK*, resistenza alle tetracicline) e pI258, per la resistenza al mercurio. Gli unici in SCC*mec* di tipo V sono *hsdR*, *hsdS* e *hsdM*, che codificano per un sistema di restrizione-modificazione che potrebbe avere un ruolo nella stabilizzazione dell'elemento (Fuda, 2005).

2.7.3 B SCC non-*mec*

SCC è un trasportatore non solo dei geni della resistenza a meticillina ed altri antibiotici, ma anche di geni di virulenza. Sono stati descritti almeno quattro tipi di SCC non-*mec* in *S. aureus* e in ceppi di CoNS. SCC*cap1* di *S. aureus* è localizzato sullo stesso sito cromosomale di tutti gli elementi di SCC*mec* e contiene il fattore di virulenza chiamato polisaccaride capsulare 1, che rende il ceppo più resistente alla fagocitosi. Ha un difetto nella mobilità poiché manca di un omologo di *ccrA* e

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

contiene un omologo di *ccrB* con una mutazione nonsense (*jccr-complex*). *SCCcap1* somiglia a *SCCmec* di tipo III. *SCCmec* del ceppo *Staphylococcus hominis* ATCC 27844 non contiene geni di antibiotico-resistenza né elementi genetici mobili. Contiene *ccrAB1* con un gene *ccrB1* intatto e non un *frameshift* mutazione come riportato nel *ccrB1* di *S. aureus*. ATCC 27844 trasporta diversi omologhi di geni di restrizione-modificazione per il mantenimento, la stabilizzazione o la difesa del DNA di SCC.

Due nuovi membri della famiglia degli SCC sono stati rilevati in *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, chiamati *SCC composite island* e *SCCpbp4*. *SCC composite island* (57 kb) non possiede *mecA*, ma trasporta due coppie di geni della ricombinasi *ccrAB* di tipo 2 e 4. È affiancato da sequenze terminali ripetute di 28 bp, specifiche di SCC. *SCC composite island* contiene anche un elemento più piccolo, *SCCpbp4* (19 kb), sito nella parte destra di *SCC composite island* e recante un omologo del gene che codifica per la PBP4 (*pbp4*). I geni *ccrAB* in *SCCpbp4* sono strettamente correlati al *ccrAB* di tipo 4 identificato in ceppi di MRSA. SCC è stato rilevato in ceppi di MSSA che trasportavano un *ccrAB* con un'altissima somiglianza al *ccrAB1* di *S. hominis* ATCC 27844 ed un determinante di resistenza all'acido fusidico Far1. Altri studi hanno mostrato che la cassetta può esistere anche senza *mec* nei CoNS (Fuda, 2005).

2.7.3 C Distribuzione dei tipi di *SCCmec*

La distribuzione di *SCCmec* in natura è limitata ad un numero relativamente piccolo di cloni di MRSA. *SCCmec* IV è stato rilevato in diversi *background* genetici, cosa che suggerisce che il tipo IV abbia un'aumentata mobilità se paragonato agli altri *SCCmec*. È il tipo di *SCCmec* dominante tra gli MRSA comunità-acquisiti (CA-MRSA) ed è raramente visibile nei ceppi di MRSA di origine nosocomiale (H-MRSA). La maggioranza dei ceppi epidemici di H-MRSA possiedono *SCCmec* di tipo I, II o III. I ceppi di *S. aureus* non multiresistenti ma oxacillino-resistenti (NORSA) hanno *SCCmec* di

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

tipo IVa o IVb. SCCmec di sottotipo IVc è stato descritto come acquisito in sede ospedaliera in Francia, ma SCCmec di sottotipo IVc sono stati riportati tra CA-MRSA in Svezia e Norvegia. La maggior parte degli isolati con tipi sconosciuti di SCCmec sono CA-MRSA. SCCmec di tipo IV e V sono presenti in diversi *background* genetici tra gli MRSA da pazienti non nosocomiali australiani. Si hanno meno informazioni riguardo alla distribuzione di SCCmec nei CoNS, ma SCCmec di tipo IV con diverse regioni J1 sono presenti in più del 30% dei CA *S. epidermidis*. In *S. epidermidis* meticillino-resistente sono stati osservati almeno 10 differenti tipologie strutturali di SCCmec. In ambiente ospedaliero, in *S. epidermidis* circa il 36% sono risultati essere SCCmec di tipo II, il 28% di tipo III e solo il 2% di tipo I. SCCmec di tipo V è distribuito anche tra i CoNS (Fuda, 2005).

2.7.3 D Origine e *reservoir* di SCCmec

L'origine di SCCmec è sconosciuta. Si pensa che il gene *mecA* di tutti gli stafilococchi discenda da un antenato comune e *Staphylococcus sciuri* potrebbe essere stato il precursore evolutivo del gene della PBP2a. E' dimostrato che si possa verificare il trasferimento orizzontale del DNA del gene *mecA* tra diverse specie stafilococciche e tra differenti generi di batteri Gram-positivi. Un'ipotesi evolutiva propone che i geni *ccr* e *mec* siano stati trasferiti insieme nei CoNS da una fonte sconosciuta, dove si è verificata la delezione dei geni regolatori e successivamente tali geni siano stati trasferiti in *S. aureus* dando origine a ceppi MRSA. Il gene determinante *mec* probabilmente fece il suo "ingresso" in *S. aureus* dopo l'introduzione della meticillina nella pratica medica. I ceppi resistenti di CoNS possono fungere da *reservoir* per i geni dell'antibiotico resistenza che possono essere trasferiti da microrganismi Gram-positivi, inclusi ceppi di *S. aureus*. L'ipotesi del trasferimento di SCCmec tra *S. epidermidis* e *S. aureus* (Wisplinghoff, 2003) è stata avvalorata da diversi fattori: SCCmec di tipo IV di *S. epidermidis* mostra un'omologia del 98-99% con SCCmec di tipo IVa di *S. aureus*. Nel resto del genoma di *S. epidermidis* solo il 17% degli ORF

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

hanno al massimo l'80% di identità con *S. aureus*, suggerendo che si sia verificato uno scambio di DNA interspecifico. I ceppi CoNS inoltre contengono geni *ccrAB* che sono identici per il 100% a quelli di *S. aureus*. Inoltre la meticillino-resistenza ha un'alta prevalenza tra i ceppi di *S. epidermidis* ed è meno comune tra quelli di *S. aureus*; più del 70% degli isolati di *S. epidermidis* in sede ospedaliera sono meticillino-resistenti. Quindi il *reservoir* di SCCmec pare essere più ampio in *S. epidermidis*. Inoltre SCCmec di tipo IV è risultato altamente prevalente tra i ceppi di *S. epidermidis* a partire dagli anni settanta e non è stato invece rilevato tra quelli di MRSA. Il primo *S. aureus* dotato di SCCmec IV è stato trovato nei primi anni ottanta. L'SCC *composite island* in *S. epidermidis* contiene tratti omologhi ad SCC trovati in altri MRSA isolati ed è stato suggerito che *S. epidermidis* funga da *reservoir* per sequenze di DNA trasferite orizzontalmente e ricombinate all'interno di elementi SCC in *S. aureus* con ricombinazione omologa. D'altra parte un'altra ipotesi (De Sousa, 2004) propone che la fonte principale di SCCmec sia proprio MRSA e che l'acquisizione di *mecA* da CoNS sia un evento infrequente. Quest'ipotesi necessita però di ulteriori indagini. Non è dunque certo quale specie di stafilococco abbia donato i cinque tipi di SCCmec rilevati negli MRSA, ma la presenza di cinque tipologie suggerisce un'introduzione multipla in *S. aureus* e la loro presenza nella stessa sequenza tipo (ST) indica che il trasferimento orizzontale dei geni *mec* è relativamente frequente in *S. aureus* (Hanssen, 2006).

2.7.4 BORSA

Esistono due tipi di meticillino-resistenza negli stafilococchi: una resistenza intrinseca di elevato livello ed una resistenza intermedia (resistenza *borderline*). Questa classificazione è stata ottenuta con metodi di rilevamento dei *pattern* di resistenza, ad esempio con la tecnica per antibiogrammi di Kirby-Bauer, con microdiluizioni e con l'E-test (*Epsilometer test*). La resistenza intrinseca di

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

elevato livello in MRSA è quella legata alla sintesi della proteina anomala PBP2a, con ridotta affinità per i β -lattamici β -lattamasi resistenti, codificata dal gene *mecA*.

Alcuni ceppi di *S. aureus*, invece, presentano una resistenza di natura non intrinseca verso gli antibiotici della famiglia della meticillina, confermata sperimentalmente dall'assenza di DNA che ibridizzi con sonde specifiche per il determinante della meticillino-resistenza (*mec*), nonché dal mancato rilevamento in questi ceppi della proteina PBP2a. I test di sensibilità a oxacillina e meticillina in questi ceppi evidenziano una sensibilità ridotta (o *borderline*) ed essi sono da ciò denominati BORSA (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus Aureus*). Il meccanismo di resistenza di questi ceppi che non presentano il gene *mecA* è molteplice: può essere legato alla produzione di proteine modificate PBP1 e 2, con una ridotta affinità per i β -lattamici, che quindi legano più lentamente le penicilline (ad esempio per un tasso ridotto di acilazione) e le rilasciano più rapidamente (ad esempio per un aumentato tasso di deacilazione) rispetto ai ceppi sensibili. Queste alterazioni di legame sono il risultato di mutazioni puntiformi nel dominio legante le penicilline, pur in assenza di PBP2a. Anche un'iperproduzione di PBP (in particolare di PBP4) può determinare bassi livelli di resistenza (**Chambers, 1987; Khorvash, 2008**). L'effetto di questi cambiamenti nella cinetica dei legami e l'effetto dell'iperproduzione di PBP è che nei batteri resistenti una maggior quantità di enzima rispetto ai ceppi sensibili è libero per la sintesi della parete batterica quando è presente l'antibiotico β -lattamico. Il ruolo dell'iperproduzione di β -lattamasi nella resistenza *borderline* è meno chiaro, anche se il meccanismo è plausibile. Dal momento che anche gli antibiotici β -lattamici β -lattamasi resistenti possono essere lentamente idrolizzati dalle β -lattamasi stafilococciche, un'iperproduzione di queste può effettivamente dare come risultato una MIC *borderline*. Condizioni colturali utilizzate per aumentare la meticillino-resistenza hanno mostrato di favorire un'iperproduzione di β -lattamasi. È stata inoltre riportata nei ceppi *borderline* iperproduttori di β -lattamasi l'esistenza di un'attività meticillinasi differente

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

da quella β -lattamasica codificata dal plasmide stafilococcico, il che fa supporre l'esistenza di una nuova β -lattamasi (piuttosto che un'iperproduzione della β -lattamasi normale) (**Chambers, 1997**). Questa meticillinasi, legata alla membrana cellulare, ha un peso molecolare di poco inferiore a quello della penicillinasi classica e parrebbe essere il prodotto di una mutazione nel gene *blaR1*, anche se in realtà il gene mutato non è ancora stato identificato con certezza. Dall'analisi del DNA plasmidico è stato rilevato che i ceppi meticillinasi-produttori hanno un comune plasmide per la β -lattamasi (17,3 kb), apparentemente identico a quello codificante per le penicillinasi nei ceppi di *S. aureus* con sensibilità *borderline* isolati da casi di infezioni nosocomiali. La perdita di questo plasmide esita in una perdita della sensibilità *borderline* (**Massidda, 1996 e 2006**).

I tipici ceppi di *S. aureus* con resistenza *borderline* alla meticillina hanno una MIC per l'oxacillina tra 2 e 4 $\mu\text{g/ml}$ ed hanno la caratteristica di diventare sensibili ai β -lattamici resistenti alle β -lattamasi in presenza di un inibitore delle β -lattamasi (ad esempio l'acido clavulanico o il sulbactam), mentre se si tratta di batteri con una MIC elevata a causa di una resistenza intrinseca ai β -lattamici, questa non si ridurrà fino a far rientrare il ceppo nei *range* di sensibilità (**Keseru, 2011; McDougal, 1986**).

Non vi sono dati clinici che suggeriscano che il livello di resistenza espresso da un ceppo *mecA*-negativo *borderline* porti ad un fallimento terapeutico. Studi mostrano che i β -lattamici semisintetici resistenti alle β -lattamasi sono efficaci nel corso di infezioni causate da ceppi *borderline mecA*-negativi. Quindi, al di là della difficoltà che si riscontra nel differenziare i ceppi *mecA*-negativi dai *mecA*-positivi che esprimano una resistenza *borderline*, il fenomeno è di ridotta se non nulla rilevanza clinica (**Chambers, 1997**).

2.8 ANTIBIOTICI GLICOPEPTIDICI

Tra gli antimicrobici che inibiscono la sintesi del peptidoglicano della parete batterica ci sono anche gli antibiotici glicopeptidici, alla cui famiglia appartengono la vancomicina, la ristocetina, la teicoplanina (con meccanismo di azione simile). Un altro glicopeptide con diffuso utilizzo in passato è l'avoparcina: il suo ampio uso come promotore di crescita negli animali da reddito in Europa ha portato alla selezione di ceppi glicopeptide/(vancomicino)-resistenti nei loro enterococchi intestinali (*Vancomycin Resistant Enterococcus*, VRE), che, conseguentemente, sono entrati nella catena alimentare umana in Europa (**Prescott, 2002**). L'uso dell'avoparcina è stato bandito in tutti i Paesi dell'Unione Europea a partire dal 1997 (**Ashford, 2011**).

Questo gruppo di sostanze è attivo verso i batteri Gram-positivi ed interferisce con la biosintesi della parete cellulare. La vancomicina, prodotta da *Streptomyces orientalis*, presenta un meccanismo d'azione complesso, in quanto forma un forte legame con la porzione terminale del pentapeptide dell'unità basale del peptidoglicano, a livello del dimero D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala), bloccando la reazione terminale di transpeptidazione e di transglicolazione, ovvero di aggiunta dell'unità basale allo scheletro di amminozuccheri nella zona di accrescimento. Provoca contemporaneamente un accumulo di molecole dell'unità basale del peptidoglicano legate al vettore lipidico (undecaprenil-fosfato) dal quale ne viene impedito il rilascio (**Mazza, 1998; La Placa, 2008**).

La teicoplanina, prodotta da *Actinoplanes teicomycetus*, è correlata chimicamente alla vancomicina e alla ristocetina. La teicoplanina viene utilizzata nel trattamento di infezioni da Gram-positivi sia aerobi facoltativi sia anaerobi obbligati e, particolarmente, nei confronti di *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

L'isolamento della molecola è avvenuto a partire dal brodo di fermentazione di *Streptomyces orientalis*, cresciuto da un campione di terreno proveniente dalla giungla del Borneo.

Ha una potente azione contro un'ampia gamma di batteri Gram-positivi. La vancomicina è stata approvata dalla *Food and Drug Administration* (FDA) nel 1958, ma inizialmente il suo utilizzo è rimasto limitato nella pratica clinica a causa dei suoi apparenti effetti collaterali, mentre la meticillina diveniva l'antibiotico di scelta nel trattamento delle infezioni da *S. aureus*. L'aumentare delle resistenze batteriche e soprattutto lo sviluppo di ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti hanno in seguito riportato l'interesse dei ricercatori sulla vancomicina. Il primo ceppo clinico isolato di *S. aureus* a resistenza intermedia alla vancomicina (*Vancomycin Intermediate S. aureus* - VISA) è stato identificato nel 1996 in Giappone quale agente eziologico di infezione *post*-chirurgica di una ferita in un bambino, non rispondente a una terapia di 29 giorni con vancomicina a 45 mg/kg/die. Questo ceppo VISA, denominato Mu50, aveva un basso livello di resistenza alla vancomicina (MIC 8 µg/ml) e una resistenza crociata alla teicoplanina (MIC 16 µg/ml) (**Tabaqchali, 1997**). I primi ceppi vancomicino-resistenti (*Vancomycin Resistant S. aureus* - VRSA) sono stati invece isolati negli Stati Uniti a partire dal 2002 (il primo in Michigan [MIC > 128 µg/ml], il secondo in Pennsylvania ed il terzo, nel 2004, a New York) (**Tenover, 2005**). Nella maggioranza dei casi i pazienti erano infettati anche da enterococchi vancomicino-resistenti, isolati contemporaneamente all'isolamento dei VRSA.

La vancomicino-resistenza è tipica in origine, come precedentemente accennato, degli enterococchi, *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*, oltre il 28% dei quali, responsabili di infezioni nei reparti di terapia intensiva negli ospedali statunitensi, è vancomicino-resistente, nonché resistenti ad un'ampia gamma di antibatterici. Il primo ceppo VRE è stato isolato nel 1988. Sono stati descritti diversi tipi di resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi. La distinzione avviene sulla base della sequenza del gene strutturale per la ligasi *van* che viene identificato con le

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

lettere del cosiddetto “Alfabeto van” (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*). Il tipo *vanA* è caratterizzato da un alto livello di resistenza sia alla vancomicina sia alla teicoplanina, mentre il tipo *vanB* possiede livelli variabili di resistenza alla vancomicina ma fornisce sensibilità alla teicoplanina. I tipi *vanD* sono caratterizzati da resistenza a moderati livelli di vancomicina e teicoplanina. I ceppi *vanC*, *vanE* e *vanG* manifestano un basso livello di resistenza alla sola vancomicina (Depardieu, 2004; Courvalin, 2006).

L'elevato livello di vancomicina-resistenza nei VRSA isolati coinvolge il trasferimento orizzontale del trasposone *Tn1546* contenente il gene *vanA* e frequentemente rilevato nei plasmidi dei VRE, come dimostrato da sperimentazioni “*in vitro*” e “*in vivo*” (Weigel, 2003; Niederhäusern, 2011). È stato documentato che gli enterococchi sono un'importante fonte di geni di resistenza ai glicopeptidi per *Listeria monocytogenes* attraverso il trasferimento di elementi genetici mobili, confermando che *Tn1546* è trasportato dai plasmidi di un'ampia gamma di ospiti, in grado quindi di superare le barriere interspecifiche (Niederhäusern, 2011).

2.8.2 VANCOMICINO-RESISTENZA

Gli attuali criteri interpretativi per la valutazione della sensibilità degli stafilococchi alla vancomicina, pubblicati dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, in passato NCCLS), designano come sensibili i ceppi per i quali la MIC per la vancomicina sia inferiore o uguale a 4 µg/ml, come intermedi quelli con MIC tra 4 e 16 µg/ml e come resistenti quelli con MIC sopra i 16 µg/ml (Niederhäusern, 2011). L'abbassamento dei limiti di MIC che individuano i ceppi resistenti da ≥ 32 µg/ml (limite precedente al 2006) a ≥ 16 µg/ml è stato effettuato con lo scopo di migliorare il valore predittivo dei risultati di sensibilità alla vancomicina da parte dei test microbiologici e di ridurre i fallimenti terapeutici nei pazienti trattati con vancomicina (Tenover, 2007).

2.8.2 A VISA e hVISA

Il primo ceppo clinico isolato di VISA (*Vancomycin Intermediate S. aureus*) (**Hiramatsu, 1997**), Mu50, aveva un fenotipo vancomicino-resistente in seguito a modificazioni nella struttura della parete cellulare, in assenza di geni *van* (MIC di 8 µg/ml). Rispetto ai ceppi MRSA, Mu50 e i ceppi Mu50-simili hanno una parete cellulare ispessita a causa dell'aumentata sintesi di peptidoglicano; le catene di peptidoglicano mostrano legami crociati significativamente ridotti (quindi si presentano più labilmente interconnessi) e un aumentato contenuto di dipeptidi D-alanina-D-alanina, che legano e sequestrano la vancomicina (**Avison, 2002**). Più spesso è la parete cellulare (Mu50>Mu3) e maggiore è il consumo di molecole di vancomicina, evento che impedisce alle molecole di glicopeptide di raggiungere il meccanismo di sintesi della parete cellulare (**Cui, 2000**). Per ceppi Mu50-simili si intendono quei ceppi cosiddetti hVISA (*heterogeneously Vancomycin-Intermediate S. aureus*) predisposti alla manifestazione della vancomicino-resistenza, con un *Pulsed-Field Gel Electrophoresis pattern* differente dai ceppi vancomicino-sensibili ma identico a Mu50, con cui condivide la stessa origine clonale. Il ceppo tipo degli stafilococchi hVISA è stato denominato Mu3, isolato da un altro paziente giapponese affetto da polmonite *post-operatoria* non rispondente a terapia con vancomicina (**Hiramatsu, 1997**). È dotato di livelli limitati di vancomicino-resistenza (MIC di 3 µg/ml), se comparati a quelli degli enterococchi vancomicino-resistenti (MIC ≥ 128 µg/ml per il fenotipo VanA e MIC ≥ 16 µg/ml per il fenotipo classico VanB) e si ritiene sia il precursore di Mu50 (**Hanaki, 1998; Cui, 2000**).

Le osservazioni sulla modificata sintesi della parete cellulare di Mu3 e Mu50 hanno portato all'ipotesi, poi confermata, che siano necessarie diverse mutazioni genetiche spontanee affinché gli stafilococchi siano in grado di acquisire la vancomicino-resistenza, ovvero dei "prerequisiti" che in seguito a un solo ulteriore cambiamento genetico permettano l'espressione della resistenza alla vancomicina. La mutazione di un singolo gene o l'acquisizione di un gene esogeno è una

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

spiegazione improbabile per la vancomicina-resistenza di Mu50, il cui livello di resistenza (MIC = 8 µg/ml) non è così elevato rispetto alle MIC degli *S. aureus* vancomicina-sensibili (MIC = 0,5-2 µg/ml). Questo livello di resistenza di Mu50 può essere meglio spiegato ipotizzando un'over-espressione di quei suoi stessi geni associati alla via di sintesi della parete cellulare. Sono state osservate diverse caratteristiche fenotipiche predisponenti nei ceppi Mu3 e MU50 (**Kuroda, 2000**). Questi aspetti, che potrebbero essere denominati collettivamente "attivata sintesi e turnover della parete cellulare" sono: un'accelerazione dell'assorbimento di N-acetilglucosamina nella cellula; un aumento dell'attività della glucosamina 6-fosfato sintetasi e della glutamina sintetasi; un rilascio più rapido di materiale della parete cellulare nel terreno colturale; un aumento della riserva citoplasmatica del monomero precursore della mureina (UDP-N-acetilmuramil-pentapeptide); un aumento della produzione di PBP2; un livello relativamente elevato di attività autolitica e un aumento della produzione di enzimi autolitici. L'assenza dei geni *van* è compatibile con la MIC di questi ceppi e suggerisce, quindi, che la loro resistenza non sia legata all'alterazione dei terminali del monomero precursore del peptidoglicano con il dipeptide D-alanina-D-alanina (**Hanaki, 1998; Kuroda, 2000**). La vancomicina-resistenza di Mu50 dipende anche dalla concentrazione di nutrienti nel terreno colturale, ovvero dei metaboliti precursori dei componenti della parete cellulare. L'aggiunta al terreno di amminoacidi componenti la parete cellulare, come alanina e glutammato, e di zuccheri, come glucosio e N-acetilglucosamina, coadiuva la cellula batterica a costruire una parete più spessa e ad esprimere livelli più alti di resistenza (**Cui, 2000; Kuroda, 2000**).

Si è rilevato che la vancomicina e le PBP (in particolare la PBP2, ma forse anche altre PBP) sono in grado allo stesso modo di bloccare stericamente il terminale D-ala-D-ala del precursore del peptidoglicano, legandosi ad esso. Quindi l'aumento della produzione di PBP2 può aumentare la concentrazione di glicopeptide necessario per interferire con l'interazione tra la PBP2 e il substrato

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

D-ala-D-ala durante la sintesi del peptidoglicano, rendendo questo processo meno vulnerabile all'inibizione glicopeptidica (**Moreira, 1997**). È comunque stato evidenziato che l'*over*-espressione di PBP2 non è di per sé sufficiente per raggiungere il livello di resistenza alla vancomicina che hanno invece i ceppi hVISA.

È stato inoltre rilevato che insieme all'aumentata produzione di PBP2 si verifica un'iperproduzione di PBP2a, senza che questo contribuisca all'aumento della vancomicina-resistenza; ciò potrebbe essere legato a qualche segnale che regola le quantità delle PBP in *S. aureus*, comune a PBP2 e PBP2a, e che determini un aumento della produzione di PBP2 con una contemporanea *up-regulation* della produzione di PBP2a (**Hanaki, 1998**).

Per indurre la vancomicina-resistenza *in vitro* in ceppi VSSA (*Vancomycin Susceptible S. aureus*), esponendo le cellule a concentrazioni selettive di vancomicina, si è osservato sperimentalmente che sono necessari due passaggi di selezione per ottenere dei ceppi VISA, ovvero VSSA-to-hVISA e hVISA-to-VISA. Entrambe le mutazioni si verificano all'interno dei geni regolatori dei sistemi regolatori bicomponenti (TCRS – *Two-Component Regulatory System*), che giocano un ruolo importante nei meccanismi di resistenza batterica, coordinando l'espressione dei geni di resistenza. I TCRS sono tipicamente composti da un'istidina-chinasi (HK) di membrana, che agisce come sensore/trasduttore di segnale attraverso la fosforilazione del suo regolatore (*response regulator* o RR) che agisce a sua volta come attivatore o repressore di trascrizione. Le mutazioni di nostro interesse si verificano a livello del sistema *vraSR* (*vancomycin-resistance associated sensor/regulator*) e del sistema *graSR* (*glycopeptide-resistance associated sensor/regulator*).

Il regolatore *VraSR* ha funzione di sistema sentinella, in grado di individuare le condizioni che minacciano di interrompere la sintesi della parete cellulare. Per quanto riguarda *vraSR* la mutazione è stata identificata in *vraS*, che codifica per una chinasi sensore o trasduttore di segnale. La mutazione di *vraS*, in cui viene sostituita la quinta isoleucina con un'asparagina, è

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

ritenuta responsabile della conversione fenotipica VSSA-to-hVISA. *vraSR* è un *up*-regolatore della sintesi della parete di *S. aureus* (**Matsuo, 2011**).

Il sistema regolatore *vraSR* è costitutivamente attivato sia in Mu50 (VISA) sia in Mu3 (hVISA), mentre è fortemente represso nei ceppi di *S. aureus* vancomicina-sensibili. *vraSR* è un promotore della sintesi del peptidoglicano della parete cellulare. La sua *over*-espressione nei ceppi VSSA riduce la sensibilità di questi ai livelli degli hVISA, ma non a quelli dei VISA (definiti da una MIC ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$). Mu3 e Mu50 hanno una comune mutazione *missense* nel gene *vraS* nella regione corrispondente all'N-terminale e la sua trascrizione è costitutivamente aumentata in entrambi i ceppi (**Neoh, 2008**). La sua attivazione induce la trascrizione di geni come *murZ*, *pbp2* e *sgtB*, che codificano rispettivamente per l'UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil-transferasi, la *penicillin-binding protein 2* e la peptidoglicano transglicosilasi (**Matsuo, 2011**).

Relativamente al sistema *graSR* la mutazione è localizzata sul regolatore della risposta *graR*. Il sistema *graSR* controlla più di 200 geni ed è coinvolto nella sensibilità di *S. aureus* verso alcuni componenti delle difese immunitarie innate dei mammiferi (come il lisozima e i peptidi cationici antimicrobici [CAMP]). Nella mutazione di *graR* vi è la sostituzione del centonovantasettesimo aminoacido (asparagina) con la serina (**Matsuo, 2011**). La sua espressione causa in Mu3 un notevole ispessimento della parete cellulare ed un aumento della MIC per la vancomicina fino al livello osservato in Mu50. La stessa *over*-espressione del solo *graR* nei ceppi VSSA in assenza di mutazioni anche in *vraS*, non determina un effetto significativo sul livello di resistenza alla vancomicina né sull'ispessimento della parete batterica. Una singola mutazione in *vraS* e *graR* altera l'espressione di più di cento geni, causando un'estrema perturbazione nell'omeostasi della cellula, fino ad arrivare ad una generazione di cellule con un nuovo equilibrio che sia adattato al nuovo ambiente ostile (**Neoh, 2008**).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

È stata recentemente evidenziata un'altra mutazione di rilievo che predispone i ceppi hVISA, dotati di diversi gradi di resistenza alla vancomicina, a passare alla popolazione VISA. È stato sottolineata l'importanza di un altro gene regolatore, *rpoB* (*RNA polymerase beta*), che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi e la cui mutazione conferisce al batterio resistenza alla rifampicina. Una mutazione di *rpoB* con sostituzione del seicentoventunesimo aminoacido, alanina, con l'acido glutammico, promuove lo sviluppo del fenotipo VISA negli hVISA. La valutazione della collezione internazionale di ceppi VISA ha portato all'osservazione che più del 70% dei ceppi VISA presenta mutazioni di *rpoB* e che la selezione di ceppi hVISA da parte di trattamenti con la rifampicina frequentemente li converte a VISA. Questa osservazione implica che l'uso combinato di rifampicina e vancomicina, nel trattamento di infezioni da MRSA, debba essere rivalutato per evitare che i ceppi MRSA possano acquisire anche la vancomicina-resistenza (**Matsuo, 2011**).

2.8.2 B VRSA

Come già accennato in precedenza, il meccanismo di resistenza agli antibiotici glicopeptidi negli enterococchi è legato ai geni *van* e l'espressione di tale resistenza richiede la produzione delle proteine VanA e VanH. VanA è una ligasi con un ampio spettro di specificità, responsabile della sintesi di un depsipeptide (= molecola in cui sono presenti sia legami esterici che peptidici) che può essere incorporato nei precursori del peptidoglicano al posto del dipeptide D-ala-D-ala. Il D-2-idrossiacido, substrato di VanA, è prodotto dalla deidrogenasi VanH. Un gruppo di cinque geni, trasportato dal plasmide *pIP816*, è sufficiente per l'espressione inducibile della resistenza ai glicopeptidi in *E. faecium*. I geni *vanR* e *vanS* codificano per il sistema regolatore bicomponente VanR-VanS che attiva la trascrizione di *vanH*, *vanA* e *vanX* (che codifica per il polipeptide VanX, con funzione sconosciuta). Questo gruppo di geni nel plasmide *pIP816* è localizzato sul trasposone

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Tn1546. La regione più a valle del gene *vanX* codifica per due proteine, VanY e VanZ, non necessarie per la vancomicina-resistenza (**Courvalin, 2006**).

È stato riportato che la trasposizione plasmidica svolge un ruolo importante nella disseminazione del gruppo di geni *van* tra i ceppi clinici di enterococchi. Comunque la possibile trasposizione di *Tn1546* nei plasmidi di un'ampia gamma di ospiti può portare alla diffusione della resistenza ai glicopeptidi ad altri patogeni umani noti per essere in grado di scambiare informazioni genetiche con gli enterococchi (**Arthur, 1993**). Tra questi vi è *S. aureus*, nel quale è stato ottenuto *in vitro* e *in vivo* il trasferimento per coniugazione della resistenza ai glicopeptidi (in particolare del gene *vanA*) da un ceppo di enterococco vancomicina-resistente, selezionando i due ceppi transconiuganti su agar contenente rifampicina ed eritromicina, mentre lo stesso risultato non è stato ottenuto usando la vancomicina (**Noble, 1992**).

Il primo ceppo di VRSA (*Vancomycin Resistant S. aureus*) (MIC ≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$) è stato isolato in Michigan nel 2002, da una donna diabetica di 40 anni, in particolare dalla coltura di uno dei tre cateteri endovenosi per emodialisi che le erano stati posizionati in successione nell'arco di un mese. La donna era stata trattata in sei mesi con vancomicina per un totale di sei settimane e mezzo, in associazione e in alternanza con vari altri antibiotici (tra cui rifampicina, gentamicina, ampicillina-sulbactam, piperacillina-tazobactam, levofloxacina, clindamicina, cefazolina, trimetoprim-sulfametossazolo, tobramicina e metronidazolo). Dalla punta del catetere era cresciuto anche un ceppo vancomicina-resistente di *Enterococcus faecalis* (MIC ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$). Successivi tamponi da ulcere podali della donna hanno rivelato la co-presenza di *S. aureus* ed *E. faecalis* vancomicina-resistenti, mentre da tamponi peri-rettali è stato isolato solo *E. faecalis* e da altri tamponi cutanei (narici, ombelico) *S. aureus* meticillino-resistente. La PCR eseguita per i *loci* per la vancomicina-resistenza ha evidenziato la presenza del solo gene *vanA*, la cui sequenza era identica a quella di *vanA* dell'*E. faecalis* isolato dalla stessa paziente (**Chang, 2003**).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Il secondo VRSA (MIC \geq 32 $\mu\text{g/ml}$) è stato isolato in Pennsylvania da un uomo di 70 anni affetto da obesità patologica, con un'anamnesi di debolezza, malessere, aumento della sonnolenza, febbre intermittente. Il ceppo è stato isolato dalla coltura del tampone di un'ulcera cronica, caratterizzata da essudato purulento, che l'uomo aveva su un tallone. Alla PCR il microrganismo è risultato positivo per *vanA* ed ulteriori PCR con *primer* specifici per i componenti di *Tn1546* hanno confermato la presenza di *vanR*, *vanS*, *vanX*, *vanY* e *vanH*, ovvero di una significativa porzione del trasposone della vancomicina-resistenza. L'analisi della sequenza di DNA del gene *vanA* coincideva con la sequenza prototipo di *vanA* di *E. faecalis*. A differenza del ceppo isolato in Michigan, non era presente sul paziente un possibile enterococco donatore per spiegare la resistenza (**Tenover, 2004**).

Il terzo VRSA (MIC \geq 64 $\mu\text{g/ml}$) è stato isolato da un uomo a New York nel 2004 e altri quattro ceppi, per i quali la MIC per la vancomicina era compresa tra 16 e 512 $\mu\text{g/ml}$, sono stati successivamente isolati sempre negli Stati Uniti (**Tenover, 2005; Tenover, 2007**). Ad oggi sono stati isolati undici ceppi di VRSA negli Stati Uniti e due in altri Paesi (Iran e India) (**Perichon, 2009; Zhu, 2010**).

Per gran parte dei VRSA isolati è stato co-isolato un enterococco glicopeptide-resistente dallo stesso paziente, fatto che suggerisce che i ceppi di MRSA abbiano acquisito *Tn1546* da enterococchi già vancomicina-resistenti.

Il trasferimento della resistenza da enterococco a MRSA può essere il risultato di uno o due eventi genetici. Il primo passaggio è il trasferimento plasmidico per coniugazione. Alcuni plasmidi enterococcici possono replicare con efficienza negli stafilococchi ed essere mantenuti stabilmente nel nuovo ospite; altri sono meno efficienti nella replicazione, vengono persi durante la divisione cellulare e si "diluiscano" nella progenie.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

In un secondo passaggio *Tn1546* può trasferirsi dal plasmide entrante a un replicone (plasmide o cromosoma) residente nel batterio ricevente; tra i ceppi isolati negli Stati Uniti tre hanno mantenuto il plasmide enterococcico con *vanA* (trasferimento in un passaggio), mentre in altri cinque *Tn1546* si è spostato dal plasmide enterococcico a un plasmide stafilococcico (trasferimento in due passaggi). Negli altri ceppi il plasmide contenente *vanA* non è stato caratterizzato.

Tra gli stafilococchi isolati alcuni esibivano una moderata resistenza alla vancomicina (MIC tra 32 e 64 µg/ml) ed una bassa resistenza alla teicoplanina (MIC di 4 e 16 µg/ml). Questi ceppi sono stati denominati LLR-VRSA (*low-level-resistant VRSA*). Gli altri ceppi VRSA mostravano una resistenza di alto livello per entrambi i glicopeptidi (vancomicina con MIC > 256 µg/ml; teicoplanina con MIC > 32 µg/ml) e sono stati chiamati HLR-VRSA (*high-level-resistant VRSA*). L'analisi dell'espressione dei geni di resistenza ha rivelato che l'attività delle peptidasi VanX e VanY, così come i precursori finali del peptidoglicano, erano simili in entrambi i ceppi, LLR e HLR-VRSA, e simili a quelli negli enterococchi di tipo VanA. Risultati simili sono stati ottenuti dall'analisi dell'accumulo dei precursori della parete cellulare in presenza e in assenza di vancomicina nel terreno colturale, in ceppi transconiuganti ottenuti *in vitro*. Allo stesso modo l'attività di VanX e VanY era significativamente più alta dopo l'induzione da parte dei glicopeptidi. Questi dati confermano l'inducibilità dell'espressione del gruppo del gene *vanA* e l'efficienza dell'espressione eterologa dell'operone *vanA* in *S. aureus*.

I ceppi LLR-VRSA avevano la copia di una sequenza di inserzione che interrompeva il gene per la transposasi di *Tn1546*. In assenza di questa proteina l'elemento genetico non può più essere trasferito. Studi successivi hanno mostrato che nei ceppi LLR-VRSA la resistenza ai glicopeptidi veniva persa con una frequenza elevata (circa nel 50% dei ceppi) dopo l'incubazione *overnight* in assenza di pressione selettiva, mentre al contrario, nelle stesse condizioni, la resistenza era

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

totalmente stabile negli isolati HLR-VRSA. La perdita di resistenza da parte dei ceppi LLR-VRSA è probabilmente il risultato di una replicazione inefficiente nel nuovo batterio ospite del plasmide enterococcico recante il determinante di resistenza.

Il tipo di resistenza VanA è inducibile da parte dei glicopeptidi. In assenza di antibiotico nel terreno di coltura la cascata della resistenza non è espressa, mentre, in presenza di un induttore (vancomicina o teicoplanina), il meccanismo di resistenza è attivato. Il periodo che precede l'espressione fenotipica della resistenza corrisponde al tempo necessario per la sintesi del precursore del peptidoglicano terminante in D-Lac e all'eliminazione della cascata della sensibilità da parte dell'azione sequenziale di VanX e VanY. L'induzione della resistenza da parte della vancomicina è ampiamente ritardata (> 8 h) negli LLR-VRSA, a differenza degli HLR-VRSA (circa 3 h). Questa prolungata *lag phase* prima della crescita potrebbe essere responsabile del mancato rilevamento della resistenza da parte dei sistemi automatici che *testano* la sensibilità *in vitro*. La combinazione del ritardo di crescita del batterio ospite con il plasmide instabile, che trasporta l'operone *vanA*, è responsabile del fenotipo LLR-VRSA.

La quantificazione dei tassi di crescita esponenziale dei VRSA e di un ceppo MRSA ricevente, isogenico di uno dei VRSA, ha rivelato che in assenza di vancomicina i tassi di crescita dei ceppi VRSA sono simili a quelli di MRSA sensibili, indicando che la riduzione nella *fitness* dei ceppi resistenti dovuta all'acquisizione di *Tn1546* è minima in assenza di induzione. Quando invece è stata indotta la resistenza con la vancomicina si è verificata un'importante riduzione nel tasso di crescita dei ceppi VRSA, comparato a quello di ceppi identici ma non indotti e ai ceppi MRSA sensibili. La riduzione della *fitness* conseguente all'induzione è stata valutata essere circa il 20-38%, indicando che la resistenza di tipo VanA è associata con un importante costo biologico per l'ospite.

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Da esperimenti *in vitro* si è osservato che il trasferimento per coniugazione del plasmide contenente *vanA* da *Enterococcus* spp. a *S. aureus* veniva ottenuto con una frequenza di 10^{-7} e il plasmide veniva mantenuto nel nuovo ospite. Quando la coniugazione aveva successo gran parte dei transconiuganti (75%) perdeva la resistenza alla vancomicina dopo alcune subcolture, confermando la relativa instabilità del plasmide. Valutate nel complesso queste osservazioni, combinate con gli esperimenti relativi al costo biologico, possono giustificare la limitata disseminazione della vancomicina-resistenza in *S. aureus* (Perichon, 2009).

Attualmente non vi è nessuna segnalazione di ceppi di *Staphylococcus* vancomicina-resistenti isolati da animali.

2.9 ANTIBIOTICI FLUORCHINOLONICI

I chinoloni (acido nalidixico, acido oxolinico, acido pipemico, acido piromidico) sono composti di sintesi che presentano come struttura di base la 4-oxo-1,4 diidrochinolina. La loro azione antibatterica è dovuta all'interazione con la girasi (topoisomerasi II) e con la topoisomerasi IV, enzimi essenziali per la replicazione del DNA batterico; la DNA girasi agisce alterando il superavvolgimento della doppia elica di DNA mentre la topoisomerasi IV separa i due filamenti di DNA permettendo la segregazione dei cromosomi all'interno delle cellule figlie. La girasi e la topoisomerasi IV sono formate entrambe da due subunità diverse: GyrA e GyrB per la girasi, GrlA e GrlB (in *E. coli* denominate rispettivamente ParC e ParE) per la topoisomerasi IV. GyrA è strutturalmente simile a GrlA e GyrB a GrlB. I chinoloni si legano soprattutto a GyrA e GrlA, inattivandole, con un'affinità variabile verso l'uno o l'altro enzima in funzione della diversa struttura molecolare dei vari derivati chinolonici. I fluorchinoloni interagiscono con il complesso enzima-DNA impedendo la progressione di questo lungo l'acido nucleico e bloccando la replicazione. Eventi successivi, non ancora chiariti, probabilmente rappresentati dalla creazione di

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

una rottura irreparabile del DNA innescata dal blocco, portano alla morte della cellula batterica. L'inattivazione degli enzimi è seguita dal blocco della neosintesi del DNA cromosomico e dalla morte del batterio.

I primi chinolonici, scoperti verso la fine degli anni cinquanta, erano mirati ai batteri Gram-negativi e sono stati impiegati esclusivamente nel trattamento delle infezioni urinarie per la loro rapida escrezione attraverso le urine. Più recentemente (anni ottanta) sono stati sintetizzati dei derivati fluorurati ad uso umano (levofloxacin, sparfloxacin, grepafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, trovafloxacin, ecc.) e ad uso veterinario (enrofloxacin, marbofloxacin, pradofloxacin, ecc.), dotati di proprietà farmacocinetiche (notevole diffusione tissutale ed apprezzabile emivita in circolo) che ne consentono l'utilizzo nel trattamento di infezioni sistemiche. Essi possiedono inoltre uno spettro d'azione più ampio (**La Placa, 2008; Hooper, 2002**).

Lo sviluppo della classe dei fluorochinoloni ha fornito un'efficace alternativa per la terapia delle infezioni gravi sostenute da ceppi multiresistenti di *S. aureus*, anche con somministrazione per via orale. Purtroppo, poco dopo l'introduzione di questi composti nell'utilizzo clinico, verso la fine degli anni ottanta, si è rilevato lo sviluppo di ceppi di *S. aureus* fluorochinolone-resistenti, soprattutto tra i ceppi meticillino-resistenti (**Ubukata, 1989**).

2.9.1 FLUORCHINOLONE-RESISTENZA

Le modalità con cui *S. aureus* sviluppa resistenza agli antibiotici fluorochinoloni sono state oggetto di intense ricerche, che hanno permesso di definire almeno tre meccanismi.

Il primo consiste in un'alterazione mutazionale della DNA girasi e della topoisomerasi IV, enzimi coinvolti nella riparazione e replicazione del DNA. Sono state descritte diverse mutazioni puntiformi in *gyrA* e *grlA* che conferiscono al batterio alti livelli di resistenza ai fluorochinoloni, la

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

maggior parte delle quali è localizzata in una piccola regione del gene adiacente ai 59 nucleotidi finali (QRDR, *quinolone-resistance determining region*). La sostituzione aminoacidica correlata con la resistenza ai fluorchinoloni in GrlA include Ser80→Phe o Tyr, Glu84→Lys e Ala116→Glu o Pro. In GyrA le mutazioni sono in Ser84→Leu o Ala, Ser85→Pro e Glu88→Lys.

Il secondo meccanismo, meno frequente, coinvolge mutazioni in *gyrB*, la subunità B del gene della DNA girasi. Gli aminoacidi sostituiti in GyrB correlati alla resistenza ai fluorchinoloni includono Asp437→Asn e Arg458→Glu. Le mutazioni in *gyrB* possono non essere stabili in ambito clinico.

Sembra che questi due meccanismi riducano l'affinità ai fluorchinoloni del complesso enzima-DNA. Il livello di resistenza dell'enzima bersaglio può aumentare se più aminoacidi sono alterati da mutazioni addizionali.

Il terzo meccanismo di resistenza consiste nell'espulsione attiva dei fluorchinoloni dalla cellula per mezzo di NorA, una proteina codificata dal gene *norA*, studiata per la resistenza alla norfloxacin. Si tratta di una pompa di efflusso multifarmaco (riduce, infatti, la sensibilità anche al cloramfenicolo e al colorante bromuro di etidio), che viene *over*-espressa nei ceppi resistenti e che conferisce al batterio un livello di resistenza più basso rispetto a quello delle mutazioni in *gyrA*. I meccanismi di trasporto, tra cui i processi di efflusso, sono utilizzati dalle cellule procariote ed eucariote in molte situazioni, inclusa l'acquisizione di nutrienti essenziali, il mantenimento della carica corretta e del gradiente di pH trans-membranario e l'espulsione di composti potenzialmente tossici. L'efflusso attivo di alcuni antibiotici è stato descritto in diversi generi di batteri ed è uno dei meccanismi grazie a cui questi organismi resistono agli effetti inibenti o letali di questi farmaci. Nonostante i fluorchinoloni siano composti sintetici e, quindi, non abbiano preso parte direttamente al processo evolutivo di selezione che, presumibilmente, ha portato allo sviluppo delle pompe di efflusso per la multiresistenza alle sostanze antibatteriche, è stato dimostrato che anch'essi sono substrato di alcune pompe. Il sistema di efflusso di un agente antimicrobico più

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

studiato è quello per le tetracicline. È stata descritta una famiglia di geni *tet* fortemente correlati e le proteine che questi esprimono sono polipeptidi integrali di membrana, cotrasportatori Tet-H⁺ (antiporto), la cui funzione dipende dal gradiente protonico (**Kaatz, 1993; Kaatz, 1997; Hooper, 2002; Takahashi, 1998**).

La proteina codificata da *norA* ha molte somiglianze con le proteine Tet dei batteri Gram-negativi (identità nella sequenza pari al 24-25%); si tratta di una proteina integrale di membrana e la sua attività di mediatore dell'efflusso di farmaci dalla cellula dipende dal gradiente protonico. La proteina NorA differisce comunque dalle proteine Tet poichè origina da un gene cromosomico che ricorre naturalmente nel genoma di *S. aureus* e che non conferisce la resistenza alla tetraciclina (**Neyfakh, 1992**).

I meccanismi di resistenza mediati da mutazioni in *gyrA*, *grlA* e in *norA* possono presentarsi da soli o in combinazione; mentre è stato rilevato che le mutazioni in *gyrA* precedono sempre quelle in *grlA*. Singole mutazioni aminoacidiche in GyrA paiono sufficienti a determinare una resistenza clinica del ceppo (ad esempio concentrazioni inibitorie che superano i limiti di sensibilità del laboratorio clinico) alla ciprofloxacina, ma non necessariamente ad altri fluorochinoloni più potenti (gatifloxacina, moxifloxacina e trovafloxacina). Per tali fluorochinoloni, in stafilococchi e streptococchi, singole mutazioni in GyrA spesso generano una ridotta sensibilità senza una completa resistenza fenotipica. Mutazioni addizionali in GrlA-84 generano solitamente una resistenza clinica completa. Il sommarsi di diverse mutazioni che conferiscono resistenza in un solo ceppo batterico può portare a valori di MIC anche molto elevati per alcuni fluorochinoloni (**Kaatz, 1993; Kaatz, 1997; Hooper, 2002; Jacoby, 2005; Intorre, 2007**).

La proteina NorA pare avere una predilezione per i fluorochinoloni idrofilici (ad esempio ciprofloxacina e norfloxacina) e quindi la sua attività influenza maggiormente le MIC di tali

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

composti rispetto ai farmaci idrofobici, più recenti, come sparfloxacin, levofloxacin, gatifloxacin e moxifloxacin (**Kaatz, 1997**).

In letteratura non sono state riportate differenze nella frequenza con cui i ceppi MRSA sensibili ai fluorchinoloni e i ceppi MSSA possono presentare le mutazioni per la resistenza ai fluorchinoloni nella selezione operata *in vitro* in laboratorio. Nonostante ciò è possibile rilevare una prevalenza dei ceppi MRSA fluorchinolone-resistenti rispetto agli MSSA. Va però evidenziato che i ceppi MRSA sono più comuni in ambiente ospedaliero, dove la trasmissibilità delle infezioni batteriche è elevata e dove il largo uso di antibiotici promuove la sopravvivenza dei ceppi MRSA rispetto ai ceppi MSSA, con un conseguente loro più facile isolamento. Inoltre, i ceppi MRSA sono solitamente multiresistenti; quindi un vantaggio selettivo di questi ceppi sugli MSSA può estrinsecarsi con l'esposizione ad un'ampia gamma di antibiotici e non solo ai fluorchinoloni. Fattori simili operano probabilmente anche negli stafilococchi coagulasi-negativi. La resistenza ai fluorchinoloni è, infatti, allo stesso modo prevalente nei ceppi CoNS meticillino-resistenti rispetto ai meticillino-sensibili (**Hooper, 2002**).

2.9.2 FLUORCHINOLONI AD USO VETERINARIO

Diverse molecole appartenenti alla classe dei fluorchinoloni sono registrate per uso veterinario, tra cui enrofloxacin, difloxacin, orbifloxacin, marbofloxacin, danofloxacin, ibafloxacin, pradofloxacin e sarafloxacin. Attualmente nel settore veterinario italiano sono diversi i prodotti a base di fluorchinoloni: enrofloxacin (Baytril®, Bayer Italia), marbofloxacin (Marbocyl®, Forcyl® e Aurizon®, Vetoquinol Francia; Aristos®, Fatro Italia), pradofloxacin (Veraflox®, Bayer Italia, autorizzazione del 9 giugno 2011).

La ciprofloxacin è registrata per l'uso nell'uomo, ma è utilizzata anche nel cane e nel gatto a seguito della sua notevole attività contro alcuni ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*, a differenza di

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

altri fluorchinoloni. Molecole più recenti o di quarta generazione, usate per il trattamento di infezioni del tratto respiratorio nell'uomo, sono disponibili per l'uso negli animali a causa della loro azione addizionale contro i batteri anaerobi e della loro migliore attività contro i microrganismi Gram-positivi (**Gottlieb, 2001**). È comunque sconsigliato negli animali l'utilizzo di fluorchinoloni ad uso umano, come levofloxacina o moxifloxacina, poiché le loro somiglianze strutturali alle molecole ad uso veterinario possono indurre in un ceppo batterico contemporanea resistenza ai fluorchinoloni ad uso umano e veterinario. È stato infatti osservato in ceppi multiresistenti di *S. pseudintermedius* lo sviluppo di una *cross-resistenza* anche a fluorchinoloni ad uso umano di terza e quarta generazione (ad esempio la moxifloxacina), raramente utilizzati nella clinica dei piccoli animali (**Yoo, 2010**). Altri studi hanno invece evidenziato un diverso *pattern* di resistenza in *S. pseudintermedius* e in *S. schleiferi*, con resistenza ai fluorchinoloni di seconda e terza generazione (enrofloxacina, levofloxacina e marbofloxacina), ma con sensibilità conservata verso le molecole di quarta generazione (gatifloxacina, moxifloxacina e trovafloxacina). È stato suggerito che i ceppi mutanti di *S. pseudintermedius*, con mutazione in *gyrA*, probabilmente mantengano la loro sensibilità ai fluorchinoloni più recenti perché necessitano di un'alterazione addizionale in *grlA* (**Intorre, 2007**).

È stata comprovata in campo veterinario l'efficacia dei fluorchinoloni nei confronti delle infezioni da *S. pseudintermedius*. Ad esempio i fluorchinoloni sono raccomandati come antibiotico di prima scelta per il trattamento delle piodermiti nel cane causate da *S. pseudintermedius*. Però è già in atto un aumento graduale della resistenza ai fluorchinoloni in *S. pseudintermedius*, segnalato nei ceppi di origine canina nel corso di piodermiti, otiti esterne ed infezioni del tratto urinario, dovuta presumibilmente ad una somministrazione eccessivamente ampia, ad inutili sovradosaggi e/o a terapie troppo prolungate (**Yoo, 2010**).

2. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Come in campo umano, anche in ambito veterinario è stata osservata una prevalenza dell'associazione, nei ceppi di stafilococco, di resistenza ai fluorchinoloni e trasporto del gene *mecA* della meticillino-resistenza. I meccanismi che stanno alla base dell'emergere di questo *pattern* di resistenza non sono chiari. È stato proposto che l'uso inappropriato dei fluorchinoloni possa potenziare l'adesione batterica mediata dalla proteina legante la fibronectina, facilitando di conseguenza la colonizzazione da parte di *S. aureus* meticillino-resistente; un'altra ipotesi è rappresentata dalla possibilità di selezionare, con terapie inadeguate con fluorchinoloni, sottopopolazioni con livelli elevati di meticillino-resistenza in ceppi di *S. aureus* multiresistenti. La trasmissione di questi ceppi tra uomo e animale, attraverso il contatto o il morso, già descritta in letteratura, ha aperto la strada all'acquisizione anche da parte di ceppi di *S. pseudintermedius* di entrambe le resistenze.

3. ASPETTI ZONOSICI

Lo sviluppo di antibiotico-resistenze si attribuisce classicamente al vasto utilizzo di sostanze antimicrobiche nell'allevamento degli animali da reddito, soprattutto a scopo metafilattico o come promotori di crescita. Dal 1969, con la presentazione del rapporto Swann sull'uso degli antimicrobici nell'allevamento e nella clinica veterinaria, è stata modificata in Europa la legislazione per l'impiego di promotori di crescita: antimicrobici con impiego terapeutico non sono più utilizzabili da allora come farmaci auxinici in Europa e in altri Paesi, come il Giappone, che ne hanno seguito l'esempio; al contrario negli Stati Uniti continua ad essere approvato l'uso in allevamento di molecole come la penicillina, l'eritromicina, la tilosina e la tetraciclina, in qualità di additivi alimentari poiché considerato *good practice* nella gestione della salute animale. Solo nel 2005 è stata ritirata dall'uso nell'allevamento del pollame l'enrofloxacin in USA, per ridurre il rischio per la salute pubblica di uno sviluppo di resistenza ai chinoloni da parte del *Campylobacter*, primo episodio negli Stati Uniti di ritiro di un farmaco per motivazioni legate alla resistenza batterica. Nella prima riunione di esperti del settore delle resistenze batteriche alle sostanze antimicrobiche, indetta da FAO (*Food and Agriculture Organization*), WHO (*World Health Organization*) e OIE (*World Organization for Animal Health*) nel dicembre 2003 a Ginevra, la catena alimentare è stata riconosciuta come la principale via di trasmissione di batteri resistenti e di geni di resistenza dagli animali all'uomo (parlando di allevamento e di acquacoltura, a cui si deve però aggiungere anche l'orticoltura) (**Guardabassi, 2008**). All'origine alimentare della diffusione di resistenze batteriche è in realtà stato attribuito un ruolo sovrastimato ed enfatizzato dalla letteratura scientifica. Di conseguenza viene sottovalutata una trasmissione di patogeni e di resistenze agli antibatterici che non abbia origine dagli alimenti (uomo↔uomo, animale↔uomo) (**Barber, 2003**) e vengono scarsamente presi in considerazione, in ospedali, poliambulatori o altri

3. ASPETTI ZONOSICI

centri clinici, studi che abbiano investigato la relazione tra l'uso di antimicrobici e le resistenze batteriche. Dati raccolti dall'EARSS su microrganismi come *S. pneumoniae*, trasportati a livello di popolazione, hanno mostrato che la vendita di antibiotici β -lattamici, macrolidi o sulfamidico associato a trimetoprim in una data area geografica è proporzionale alla resistenza microbica alla penicillina della stessa regione. L'efficacia delle sostanze antimicrobiche viene monitorata in diversi Paesi europei, per valutare i *trend* di sviluppo delle resistenze batteriche, all'interno di piani nazionali per l'uso appropriato degli agenti antibatterici (**EARSS, 2003**).

Accanto all'uso inappropriato dei farmaci in medicina umana (terapie spesso superflue con antimicrobici ad ampio spettro d'azione, auto-medicaioni, inadeguate dosi, tempi e vie di somministrazione) non è però da trascurare il ruolo che la medicina veterinaria e gli animali d'affezione giocano nello sviluppo di resistenze agli antimicrobici che possono interessare, oltre ai batteri commensali e patogeni di origine animale, anche i patogeni umani. Gatti e cani rappresentano infatti una potenziale fonte di diffusione di antibiotico resistenze dovute all'esteso uso di agenti antimicrobici in questi animali e soprattutto al loro stretto contatto con l'uomo. Il numero di gatti e cani è considerevolmente aumentato nella società moderna (oltre 70 milioni negli stati europei). Il rapporto tra gli animali da compagnia e l'uomo è radicalmente cambiato nel corso degli anni, con un contatto reciproco sempre più stretto. Mentre nel passato i cani erano tenuti fuori dall'abitazione, ora vivono frequentemente all'interno delle case. Il rapporto ravvicinato (contatto, cura, leccamento) si verifica con elevata frequenza sulla base dell'attuale percezione dell'animale da compagnia come membro della famiglia. Questo stretto contatto offre condizioni favorevoli alla trasmissione di batteri sia da uomo ad animale che viceversa, anche attraverso l'ambiente domestico (contaminazione di cibo, mobili, ecc.). I bambini sono esposti ad un rischio maggiore rispetto agli adulti a causa del più stretto contatto con cani e gatti e con ambienti domestici contaminati (pavimenti, tappeti, ecc.) (**Guardabassi, 2004**).

3. ASPETTI ZONOSICI

Date queste premesse, di nostro interesse è il trasferimento orizzontale dei geni della resistenza, associato allo scambio di batteri (patogeni e commensali). Questo può verificarsi anche nella direzione opposta al trasferimento dei batteri. Ad esempio batteri umani trasferiti agli animali domestici possono acquisire geni di resistenza dalla flora commensale animale e venire selezionati da trattamenti antimicrobici in questi animali. Oppure i batteri commensali degli animali domestici possono acquisire elementi genetici che gli conferiscano una resistenza caratteristica di patogeni umani, anch'essi selezionati dalle terapie antibiotiche applicate in medicina umana (**Guardabassi, 2004**). In realtà il problema della resistenza agli antimicrobici dei batteri patogeni isolati dai piccoli animali dovrebbe essere meno grave rispetto a quello dei patogeni nell'uomo; gli animali domestici sono sottoposti meno frequentemente dell'uomo a trattamenti antimicrobici e comunque di breve durata e sporadici, sono meno comunemente ospedalizzati, gli animali cronicamente malati possono essere sottoposti ad eutanasia e gli animali immunocompromessi non sono comunemente trattati con farmaci antimicrobici molto potenti o a spettro d'azione estremamente (**Prescott, 2002**).

Attualmente però nella clinica dei piccoli animali si assiste all'aumento dell'utilizzo di alcuni antibiotici ad ampio spettro e ad un dosaggio più elevato rispetto a quanto previsto per gli animali da reddito. La tendenza dei veterinari a prescrivere antimicrobici ad ampio spettro può essere spiegata dal timore di un possibile fallimento terapeutico con l'utilizzo di antibiotici di prima scelta come le penicilline e i sulfamidici. Inoltre i fallimenti terapeutici sono dannosi per la salute dell'animale e scoraggiano il proprietario che deve pagare ulteriori consulti e farmaci, inducendolo a mettere in dubbio l'efficacia dei diversi trattamenti. Anche le ditte farmaceutiche possono avere delle responsabilità a causa della pressione pubblicitaria sui veterinari per l'uso dei più nuovi chemioterapici in casi dove farmaci vecchi sono ancora efficaci. Infine alcuni tipi di infezione (ad esempio piodermiti o alcune forme di otite esterna) richiedono spesso trattamenti prolungati e

3. ASPETTI ZONOSICI

ripetuti, mentre piodermiti ricorrenti causate da *S. pseudintermedius* sono spesso trattate con cefalessina con terapie a basso dosaggio o ripetute periodicamente (**Guardabassi, 2004**). Si stima che ad oggi più di metà di tutti gli antimicrobici prodotti nel mondo siano utilizzati negli animali, da reddito e da compagnia (**Guardabassi, 2008**).

La trasmissione di batteri tra animale domestico e uomo è legata prevalentemente ai coagulasi-positivi *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius*.

S. aureus meticillino-resistente (MRSA) è un patogeno di origine nosocomiale, ma cloni di MRSA sono diffusi anche in una significativa porzione di individui sani nella popolazione, facilitando la propagazione delle infezioni tra uomo e uomo e tra uomo e animale e viceversa (**Waller, 2005**).

La prima indicazione che gli animali da compagnia potrebbero essere un *reservoir* di infezione da MRSA umano è stata fornita nel 2003 da uno studio nel quale ricorrenti infezioni in un paziente umano erano associate alla presenza di MRSA nel cane domestico (**Manian, 2003**). Studi successivi hanno valutato l'associazione tra l'isolamento di MRSA in animali da compagnia e casi di infezione nei proprietari (**Van Duijkeren, 2005**) e veterinari (**Weese, 2006**). La trasmissione di MRSA tra animali da compagnia e personale veterinario è stata riportata in Canada (**Weese, 2005**), in Inghilterra e in Irlanda (**O'Mahony, 2005; Loeffler, 2005; Moodley, 2006**). Viceversa manovre di tipo medico-chirurgico in animali ospedalizzati possono portare alla trasmissione di infezioni da parte di patogeni umani. Se nell'uomo è, ad esempio, segnalato l'aumento della trasmissibilità di infezioni da *S. aureus* meticillino-resistente attraverso la cateterizzazione intravenosa, così è stato osservato anche per il cane e per il cavallo, con la segnalazione di morti associate a infezioni da MRSA (**Faires, 2010**).

La trasmissione animale-uomo è suggerita dal fatto che cloni di MRSA isolati dal personale delle cliniche veterinarie generalmente corrispondono a quelli rilevati in grandi e piccoli animali

3. ASPETTI ZONOSICI

domestici frequentanti le cliniche stesse. Inoltre la proporzione di MRSA trasportati a livello nasale da personale veterinario è significativamente più alta rispetto alla stima della prevalenza nella popolazione (**Guardabassi, 2008**). In alternativa altri aspetti correlati alla professione veterinaria, come ad esempio il maneggiare antibiotici e disinfettanti, potrebbe spiegare questa osservazione (**Loeffler, 2005**).

Il trasporto di MRSA da parte degli animali domestici può essere un rischio per i proprietari, soprattutto se questi ultimi hanno un'elevata sensibilità alle infezioni. Comunque è da sottolineare che sembra che gli animali domestici diventino un *reservoir* di MRSA solo attraverso l'esposizione ad umani infetti e che non costituiscano il serbatoio primario ma si comportino da serbatoio secondario (**Guardabassi, 2004**).

La trasmissione diretta di batteri, inclusi gli antibiotico-resistenti, dagli animali alle persone che lavorano o vivono in contatto con loro, è ulteriormente supportata dal comune isolamento di *S. pseudintermedius* dalle cavità nasali di veterinari e proprietari di cani con dermatiti atopiche. *S. pseudintermedius* è una specie commensale degli animali domestici, frequentemente associata con infezioni opportunistiche di cute, orecchio e tratto urinario nel cane. Il fatto che la presenza di *S. pseudintermedius* sia normalmente rara nelle cavità nasali umane suggerisce la trasmissione animale-uomo. I ceppi trasportati da proprietari di cani sono generalmente correlati con i ceppi isolati dai rispettivi animali, con multiresistenza ad antimicrobici come penicilline, acido fusidico, macrolidi, lincosamidi, tetracicline e cloramfenicolo (**Guardabassi, 2008; Paul, 2011**). Ceppi di *S. pseudintermedius* meticillino-resistenti (MRSP) sono stati isolati da cani ed è stato dimostrato il trasferimento di ceppi di MRSP da cani affetti da pododermite profonda ai rispettivi proprietari (**Waller 2005; da Gortel, 1999; Kania, 2004; Guardabassi, 2004**). Dalla prima rilevazione di MRSP in Europa sono stati riportati casi di infezione umana da *S. pseudintermedius* meticillino-resistente in Belgio (**Van Hoovel, 2006**), in Italia (**Campanile, 2007**), in Svizzera (**Stegmann, 2010**) e negli Stati

3. ASPETTI ZONOSICI

Uniti (**Kempker, 2009**). La trasmissione tra animali e personale addetto in cliniche veterinarie è stata documentata in Giappone (**Sasaki, 2007**) e nei Paesi Bassi (**van Duijkeren, 2008**); il trasporto da parte di medici veterinari dermatologi di MRSP a livello nasale è stato recentemente riportato da due studi che hanno rilevato una prevalenza rispettivamente del 5% negli Stati Uniti (**Morris, 2010**) e del 3,9% in Italia (**Paul, 2011**).

Dal punto di vista della potenzialità zoonosica attualmente in Europa il clone stafilococcico meticillino-resistente prevalente è il *Sequence Type 71* (MRSP ST71). Diffusosi rapidamente nella popolazione canina europea è ora fonte di preoccupazione a causa della sua elevata multiresistenza ai farmaci comunemente utilizzati nella terapia delle infezioni da stafilococchi.

Un altro clone potenzialmente zoonosico è l'MRSA ST398, stafilococco del suino con scarso potere patogeno in questa specie, poiché da infezioni subcliniche e con impatto limitato sulla produttività, caratterizzato da resistenza alle tetracicline (largamente usate nell'allevamento del suino). È però estremamente diffuso e la sua trasmissione ad ampio raggio sul territorio europeo è legata alla commercializzazione di suini contaminati (**Guardabassi, 2011**). La trasmissione all'uomo avviene per contatto diretto con animali positivi o attraverso un ambiente contaminato, con elevate percentuali di colonizzazione in allevatori e personale veterinario, con segnalazioni di vari casi di infezione (**Pan, 2009; Smith, 2011**). La trasmissione a persone che non lavorano a contatto coi suini sembra essere poco frequente, quindi l'impatto zoonosico per ora pare essere limitato all'ambiente ristretto dell'allevamento; è invece fonte di preoccupazione in quei Paesi con una bassa prevalenza di MRSA nell'uomo ed un'elevata produzione suinicola, ad esempio l'Olanda e la Danimarca (**Guardabassi, 2011**).

Se è indaginoso dimostrare il trasferimento di batteri resistenti da animale a uomo, è ancora più difficile provare il trasferimento dei geni della resistenza. Mentre nel primo caso l'esecuzione

3. ASPETTI ZONOSICI

dell'antibiogramma e la tipizzazione molecolare dei ceppi in questione può fornire valide informazioni per confermare o escludere la stretta relazione tra ceppi resistenti isolati dagli ospiti animali e umani, il rilevamento dello stesso gene di resistenza in batteri provenienti da entrambe le fonti può rappresentare un suggerimento, non una prova del trasferimento di tale gene da una fonte specifica (**Guardabassi, 2004**).

Da un punto di vista evolutivo è stato proposto che *S. aureus* potrebbe aver acquisito il gene *mecA* da *S. sciuri*, una specie frequentemente isolata negli animali e recante nel genoma un omologo strutturale di *mecA*, che in questo batterio ha una normale funzione fisiologica non correlata alla resistenza agli antibiotici β -lattamici (**Loeffler, 2005; Fuda, 2005**). Uno studio del 2002 valuta l'evoluzione dei cloni di MRSA e, pur non identificando la specie di origine dei diversi tipi di SCC*mec*, elementi genetici mobili rilevati nei ceppi di MRSA, suggerisce la loro introduzione multipla in *S. aureus* e la loro presenza nello stesso stafilococco indica che il trasferimento orizzontale di *mecA* è relativamente frequente in *S. aureus* (**Enright, 2002**). Il trasferimento del gene *mecA* è stato oggetto di studi approfonditi (**Archer, 1994**) che hanno dimostrato infine la sua trasmissibilità da ceppi di stafilococchi meticillino-resistenti a ceppi sensibili anche *in vivo* (**Wielders, 2001**).

I complessi di geni *ccr* e *mec*, che sono alla base della tipizzazione di SCC*mec*, codificano per ricombinasi sito-specifiche, responsabili della mobilità della cassetta cromosomica (**Malik, 2005**). Sono stati inizialmente introdotti in stafilococchi coagulasi-negativi da una fonte non certa dove si era verificata la delezione dei geni regolatori e successivamente in *S. aureus*. *ccr* e *mec* permettono il trasferimento di SCC*mec* da ceppi resistenti a ceppi sensibili. La capacità di stafilococchi antibiotico resistenti di colonizzare gli animali ha di conseguenza aperto la via alla possibilità di trasferire SCC*mec* ai più comuni patogeni animali quali *S. pseudintermedius* (**Waller 2005**).

4. SCOPO DEL LAVORO

Alla luce del rischio emergente connesso alle infezioni da stafilococchi negli animali e in particolare in quelli da compagnia, a stretto contatto con l'uomo, e del recente emergere della meticillino-resistenza anche in medicina veterinaria, prima in ceppi trasferiti da uomo ad animale (*Methicillin-Resistant S. aureus* - MRSA) poi in ceppi specificamente di origine animale (*Methicillin Resistant S. pseudintermedius* - MRSP) lo scopo di questo studio è stato la valutazione della prevalenza di stafilococchi meticillino-resistenti, caratterizzati dalla presenza del gene *mecA* della resistenza alla meticillina, in alcuni campioni afferiti da gennaio 2009 ad aprile 2010 al laboratorio di Batteriologia della Sezione di Microbiologia e Immunologia, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano.

Di nostro interesse è stata la comparazione di diversi sistemi di identificazione dei ceppi di stafilococchi con l'utilizzo di terreni selettivi, *kit* biochimici miniaturizzati e metodi molecolari al fine di individuare il procedimento più efficace, rapido ed economico per la valutazione delle specie di stafilococchi causanti patologia negli animali da compagnia.

È stato inoltre valutato lo spettro di resistenze antibiotiche dei diversi ceppi, anche in relazione alla positività alla meticillino-resistenza, testando le principali classi di antibiotici utilizzati per la terapia in medicina veterinaria, a cui abbiamo aggiunto la vancomicina, per individuare eventuali resistenze emergenti. Particolare attenzione è stata posta alla resistenza individuata verso i fluorchinoloni, ampiamente sfruttati in terapia in Italia.

5. MATERIALI e METODI

5.1 Raccolta dei campioni e preliminare tipizzazione dei ceppi

La ricerca è stata condotta su 36 ceppi di *Staphylococcus* raccolti nel periodo Gennaio 2009 – Aprile 2010 e processati presso la Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano. Sono stati inclusi nello studio i campioni provenienti da pazienti sottoposti a visita presso strutture appartenenti al Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Milano e da pazienti di strutture ambulatoriali esterne all'università. I tamponi sono stati effettuati su 3 gatti e su 33 cani con caratteristiche eterogenee per quanto riguarda età, sesso e razza, e da diverse sedi di prelievo (**Tab. 5.1-1**).

I campioni sono stati processati seguendo i criteri *standard*, che prevedono la semina del campione per strisciamento per quadranti su piastre di Tryptone Soya Agar contenente il 5% di sangue di pecora (Oxoid, Italia), incubate per 18-24 ore a 37°C in condizioni di aerobiosi.

Dopo il periodo di incubazione sono state selezionate le colonie con caratteristiche macroscopiche sovrapponibili a quelle tipiche degli stafilococchi e, per conferma dell'appartenenza al genere *Staphylococcus*, è stata effettuata per tutti i campioni la colorazione di Gram, la prova della catalasi, dell'ossidasi (Oxoid, Italia) e della coagulasi con plasma di coniglio (Oxoid, Italia). I ceppi isolati sono stati seminati su terreno differenziale Mannitol Salt Agar (Oxoid, Italia).

Ogni ceppo è stato sottoposto ad un'identificazione preliminare per mezzo del sistema biochimico miniaturizzato API-Staph[®] (BioMérieux, Francia), costituito da una galleria formata da 20 test biochimici e basata sullo schema identificativo elaborato da Kloos e Schleifer (**Kloos e Schleifer**,

5. MATERIALI e METODI

1975; Gemmel e Dawson, 1982). L'esecuzione della metodica è avvenuta secondo i criteri forniti dalla casa produttrice.

CEPPO	ANIMALE	Sede di prelievo	Trattamenti antibiotici precedenti
1	Cane pastore della Brie maschio 4 anni	ferita chirurgica	ceftriaxone
2	Cane meticcio femmina sterilizzata 7 anni	cute	NT
3	Cane meticcio maschio 3 anni	articolazione gomito	NT
4	Gatto C.E. maschi 10 anni	ferita chirurgica	enrofloxacin
5	Cane meticcio femmina sterilizzata 7 anni	cute	NT
6	Cane bulldog maschio 6 anni	cute	enrofloxacin
7	Cane bracco it. maschio 5 anni	cute	enrofloxacin
8	Cane pastore ted. maschio 9 anni	urina	sulfamidico e trim. + cefalessina
9	Cane schnautzer maschio 15 anni	cute	ciprofloxacina
10	Cane labrador maschio 2 anni	liquor	NT
11	Cane golden ret. femmina sterilizzata 1 anno	orecchio	NT
12	Cane american staff. maschio 10 anni	cute	NT
13	Cane meticcio femmina 3 anni	cute	NT
14	Cane bassotto maschio 9 anni	sieroma	cefazolina
15	Cane pastore ted. femmina 13 anni	cute	NT
16	Cane meticcio femmina 1,5 anni	orecchio	amoxicillina + ac. clav.
17	Cane meticcio maschio 7 anni	cute	NT
18	Gatto C.E. maschio sterilizzato 1 anno	urina	NT
19	Cane bracco it. maschio 5 anni	cute	cefalessina + enrofloxacin
20	Cane jack russel femmina 5 anni	cute (lesioni da termoforo)	NT
21	Cane pastore ted. maschio 8 anni	cute	cefovecina
22	Gatto C.E. maschio 5 anni	orecchio	polimixina
23	Cane meticcio maschio 4 anni	cute	enrofloxacin
24	Cane meticcio femmina 10 anni	orecchio	NT
25	Cane boxer maschio 6,5 anni	cute	ciprofloxacina
26	Cane dobermann maschio 6 mesi	urine	NT
27	Cane yorkshire maschio 13 anni	occhio	NT
28	Cane pastore ted. femmina 10 anni	cute	NT
29	Cane labrador maschio 7 anno	cute	NT
30	Cane meticcio maschio 6 anni	orecchio	NT

5. MATERIALI e METODI

31	Cane yorkshire femmina 2,5 anni	occhio	NT
32	Cane meticcio femmina 12 anni	orecchio	NT
33	Cane meticcio maschio 6 anni	orecchio	NT
34	Cane meticcio femmina 8 anni	cute	NT
35	Cane beagle maschio 3 anni	cute	NT
36	Cane setter irl. femmina 4 anni	orecchio	NT

Tab. 5.1-1: Provenienza dei ceppi di stafilococchi selezionati per la ricerca. NT: nessun trattamento nei dieci giorni precedenti il prelievo.

I substrati dei *test* sono stati ricostituiti con l'aggiunta di una sospensione omogenea del microrganismo da tipizzare, a partire da una subcoltura pura in fase di crescita e alla concentrazione consigliata dalla metodica fornita dalla ditta (0,5 della scala torbidimetrica McFarland). Le reazioni che avvengono durante il periodo di incubazione (24 ore a 37°C) si traducono in viraggi di colori spontanei o rivelati grazie all'aggiunta di reattivi (VP1 e VP2, NIT1 e NIT2, ZYM A e ZYM B) forniti con la galleria. La lettura delle reazioni viene eseguita con l'aiuto di una tabella, che fornisce, per ogni microrganismo, un profilo numerico di sette cifre che viene poi interpretato consultando un apposito indice analitico. L'identificazione è associata ad una percentuale di affidabilità (%ID), con un valore accettabile $\geq 80\%$.

5.2 HRM per l'identificazione dei ceppi

I *test* molecolari per l'identificazione dei diversi ceppi sono stati effettuati dal dr. Michele Mortarino e dalla dr.ssa Francesca Albonico presso la Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Degli Studi di Milano.

È stata effettuata un'analisi di *High Resolution Melt* (HRM) PCR per ottenere un'identificazione molecolare dei ceppi senza ricorrere al sequenziamento, utilizzando come sequenza *target* la

5. MATERIALI e METODI

sequenza del gene *gyrA* (vedasi il paragrafo 5.3.1 pag. 108: PCR per il rilevamento di *gyrA* e *grlA*). Tale sequenza è stata confrontata nelle differenti specie di stafilococchi previo allineamento delle sequenze presenti nelle banche dati (GenBank) ed è stato rilevato che presenta delle mutazioni interspecifiche tali da permettere la differenziazione di specie. Sono state utilizzate come specie di controllo *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. pseudintermedius*, provenienti dalla ceppoteca dell'istituto e fatti sequenziare per verifica prima dell'analisi HRM (Primm srl, Milano).

È stato effettuato per ogni isolato un puntato da una singola colonia in coltura pura su piastre di agar sangue, poi posto in una provetta Eppendorf contenente 50 µl di acqua pura da biologia molecolare. La lisi delle cellule batteriche è stata ottenuta con 3 trattamenti termici da 5 minuti ognuno rispettivamente da 95°C e da -80°C, con conseguente estrusione del DNA dalle cellule. Il lisato così ottenuto è stato sottoposto ad amplificazione con reazione di HRM-PCR. Ogni reazione di amplificazione è stata effettuata con 1 µl di lisato batterico, 7,5 µl di Supermix SsoFast EvaGreen Biorad, 0,45 µM di ciascun *primer* e H₂O fino a raggiungere un volume totale di 15 µl. Gli amplificati sono stati fatti correre su un EcoTM Real-Time PCR System (Illumina, USA), secondo il protocollo termico raccomandato dalla ditta produttrice: 95°C per 5', 45 cicli alternando 95°C per 15'' e 58°C per 1', poi 3 cicli di *melt* rispettivamente a 95°C, 55°C e 95°C.

5.3 Valutazione della sensibilità dei ceppi isolati ai chemioantibiotici

Per ogni ceppo è stato valutato il profilo di suscettibilità antibiotica e l'eventuale presenza di multiresistenze verso i principali antibiotici utilizzati nella pratica clinica veterinaria. La metodica utilizzata è stata quella di diffusione in agar o tecnica di Kirby-Bauer con terreno di Muller-Hinton (Oxoid, Italia). La sospensione batterica è stata ottenuta prelevando una colonia da colture pure

5. MATERIALI e METODI

creciute su piastre di agar sangue e stemperandola in 5 ml di soluzione fisiologica sterile fino ad ottenere una soluzione di densità pari al punto 0,5 della scala McFarland. L'inoculo è avvenuto per mezzo di un tampone sterile intinto nella sospensione e strisciato in almeno tre direzioni sul terreno agarizzato. Sono stati poi deposti sulla superficie del terreno i dischetti contenenti i diversi principi attivi. Per tutti gli antibiotici sono stati utilizzati dischetti Oxoid, mentre l'enrofloxacin ci è stata fornita dalla Bayer (Italia) e la marbofloxacin dalla ATI (Italia). Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore sono stati misurati gli aloni di inibizione della crescita batterica e i risultati sono stati interpretati sulla base degli schemi interpretativi delle ditte che hanno fornito i diversi antibiotici testati (**Tab. 5.3-1**).

Antibiotico	Simbolo	Resistente	Intermedio	Sensibile
Amoxicillina	AML	≤ 28	-	≥ 29
Amoxicillina + ac. Clavulanico	AMC	≤ 19	-	≥ 20
Cefalessina	CL	≤ 14	15-17	≥ 18
Clindamicina	DA	≤ 14	15-20	≥ 21
Doxiciclina	DO	≤ 12	13-15	≥ 16
Enrofloxacin ¹	ENR	≤ 18	19-21	≥ 22
Gentamicina	CN	≤ 12	13-14	≥ 15
Marbofloxacin ²	MAR	≤ 14	14-17	≥ 18
Meticillina	MET	≤ 9	10-13	≥ 14
Co-trimossazolo (sulfamidico + trimetoprim)	SXT	≤ 10	11-15	≥ 16
Vancomicina	VAN	≤ 9	10-11	≥ 12

Tab. 5.3-1: Diametri degli aloni di inibizione per dischetti antibiotati Oxoid su Muller-Hinton agar.

¹ Valori forniti dalla Bayer per enrofloxacin.

² Valori forniti dalla ATI per marbofloxacin.

5. MATERIALI e METODI

Per meticillina e vancomicina in particolare sono state poi effettuate anche le prove per la valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) in micrometodo.

L'esecuzione delle MIC è stata effettuata utilizzando il sistema delle microdiluizioni in brodo. Sono state utilizzate piastre Microtiter (Costar, Italia) a 96 pozzetti a fondo conico. In ogni pozzetto (da A ad H e da 1 a 12) sono stati aggiunti 100 µl di brodo Muller-Hinton (Oxoid, Italia). Sono state allestite le soluzioni madre per gli antibiotici testati pari a 1 mg/ml, mediante diluizione delle polveri (meticillina sale sodico e vancomicina cloridrato, Sigma Aldrich, Italia) in acqua distillata sterile.

Le soluzioni madre sono state poi ulteriormente filtrate (utilizzando filtri di acetato di cellulosa con pori del diametro di 0,22 µm – Millipore, Italia) per assicurarne la sterilità microbiologica, sebbene la contaminazione batterica della polvere sia estremamente rara (**Andrews, 2001**). Al pozzetto numero 1 sono stati aggiunti 100 µl di soluzione madre, miscelandoli fino ad ottenere una soluzione omogenea con una concentrazione di 0,5 mg/ml e da questo sono state eseguite diluizioni seriali in base due fino al pozzetto numero 10, in un *range* di diluizioni da 0,5 mg/ml a 0,001 mg/ml. Da quest'ultimo sono stati eliminati 100 µl dopo miscelazione. Ai pozzetti 11 (controllo positivo) e 12 (controllo negativo) non è stata aggiunta la soluzione madre. Per ogni microrganismo è stata allestita una sospensione pari a 10⁴ UFC/ml. Sono stati aggiunti 50 µl di questa sospensione ad ogni pozzetto (dalla colonna 1 alla 11 e dalla riga A alla H). Le piastre così allestite sono state incubate a 37°C per 18-20 ore in condizioni di aerobiosi.

5.3.1 PCR per il rilevamento di *gyrA* e *qrlA*

Si ringraziano di nuovo per l'esecuzione della PCR il dr. Michele Mortarino e la dr.ssa Francesca Albonico, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Degli Studi di Milano.

5. MATERIALI e METODI

Da tutti i 36 ceppi analizzati, sono stati selezionati 6 ceppi di *S. pseudintermedius* meticillino-resistenti, tutti di derivazione cutanea. Tali ceppi sono stati testati per valutare la loro sensibilità o resistenza anche nei confronti di due fluorchinoloni, enrofloxacin e marbofloxacin, con il metodo Kirby-Bauer, ed è stata individuata per ogni ceppo la MIC relativa ai due fluorchinoloni scelti. Inoltre questi ceppi sono stati sottoposti ad analisi molecolare con PCR classica per individuare l'eventuale presenza dei geni *gyrA* e *griA* della resistenza ai fluorchinoloni.

È stato effettuato un puntato da una singola colonia di ogni isolato di *S. pseudintermedius* da coltura pura cresciuta su agar sangue. Il prelievo è stato posto in una provetta Eppendorf contenente 50 µl di acqua per biologia molecolare. Sono stati ripetuti per tre volte cicli alternati di 5 minuti ognuno rispettivamente a 95°C e a -80°C, per ottenere la lisi cellulare e l'estruzione del DNA dalla cellula batterica. Il lisato è stato sottoposto ad amplificazione con PCR diretta. Le sequenze codificanti dei geni *gyrA* e *griA* di *S. pseudintermedius* sono state ottenute da GenBank. Le sequenze dei *primer* della QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) di *gyrA* e *griA* sono disponibili in letteratura per altre specie di *Staphylococcus* (Intorre, 2007) e sono state adattate per *S. pseudintermedius* come segue: per *gyrA primer forward* 5'-ATGAGTGTTATCGTATCTCGTG-3' e *primer reverse* 5'-CCATCGAACCGAAGTTACCTTG-3'; per *griA primer forward* 5'-AATACGTATGATAAGAATTTCCG-3' e *primer reverse* 3'-GGGTTGTATCATCATAGTTAG-5'. La reazione di PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 µl contenenti 1 µl di DNA genomico per ogni campione, 1X di Taq *buffer* contenente 1,5 mM di MgCl₂ e 0,2 mM di dNTPs, 1,25 U di Taq Promega e 0,5 µM di ogni *primer*. Il profilo termico usato per l'amplificazione è stato: 94°C per 90", 35 cicli a 94°C per 45", 51°C per 30", 72°C per 90" ed il passaggio finale di allungamento a 72°C per 300". L'amplificazione è stata effettuata in un termociclatore *Mastercycler Gradient* (Eppendorf AG, Germania). I prodotti dell'amplificazione sono stati fatti correre su gel di agarosio con 2% di bromuro di etidio e successivamente visualizzati ai raggi UV.

5. MATERIALI e METODI

La specificità dell'amplificazione con PCR è stata verificata con purificazione dell'amplicone seguita dal sequenziamento del DNA. Più specificamente gli ampliconi specie-specifici sono stati fatti correre su gel di agarosio con 2% di bromuro di etidio e successivamente visualizzati ai raggi UV e purificati con il *kit* Qiaquick™ Gel Extraction (Qiagen GmbH, Germania). La concentrazione degli ampliconi purificati è stata misurata con l'ausilio di uno spettrofotometro ND-100. I prodotti purificati dell'amplificazione sono stati sequenziati con l'utilizzo di tecnologia *standard* Applied Biosystems su ABI Prism 310 DNA *Sequencer* (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state allineate alle sequenze *target* attese con ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

7.4 PCR per il rilevamento del gene *mecA*

La PCR è stata eseguita in collaborazione con il dr. Michele Mortarino e la dr.ssa Francesca Albonico della Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Degli Studi di Milano.

Per tutti i ceppi di *Staphylococcus* è stato effettuato un rilevamento rapido della meticillino-resistenza tramite PCR per il gene *mecA*. Questa PCR è diventata il *gold standard* per il rilevamento della meticillino-resistenza perché quest'ultima è spesso eterogeneamente espressa *in vitro* (**Chambers, 1997**). Come *primers* sono stati utilizzati quelli descritti nell'articolo di Zubeir, 2007 e Strommenger, 2003, forniti dalla ditta Primm srl, Milano. L'amplicato atteso era di 532 bp. Sono stati fatti due puntati per ogni isolato, poi messi in 50 µl di acqua pura da biologia molecolare. I batteri sono stati quindi rotti con 3 trattamenti termici da 5 minuti ognuno rispettivamente da 95°C e da -80°C ed è stata eseguita direttamente la PCR sul DNA rilasciato.

5. MATERIALI e METODI

Le reazioni di PCR per il gene *mecA* sono state effettuate in un termociclatore Mastercycler Gradient della Eppendorf e le condizioni utilizzate sono state le seguenti:

- 1 µl DNA;
- 0,2 mM dNTP;
- Buffer Promega 1X;
- 1.25U Taq Promega;
- 0,5 µM *primer forward e reverse* ;
- H₂O fino a 20 µl.

Il volume finale della reazione, per ogni singolo campione, è stato di 20 µl. La miscela (*mix*) dei vari componenti della PCR è stata preparata in un'unica eppendorf da 1.5 ml in quantità sufficiente per il numero stabilito di campioni, aggiungendo la Taq polimerasi per ultima, al fine di preservarla dall'inattivazione e anche di controllare la partenza della reazione. In seguito, 19 µl di questa *mix* sono stati distribuiti in Eppendorf da 0.5 ml in cui era stato posto 1 µl di DNA bersaglio. Ogni reazione di PCR è stata corredata di controllo negativo, ovvero di una provetta contenente esclusivamente la *mix* e senza DNA bersaglio.

È stato utilizzato il seguente programma della PCR Eppendorf:

1:	94 °C	4'00''
2:	94 °C	0'30''
3:	55 °C	0'30''
4:	72 °C	1'00''
5:	ripetere 39 volte dal punto 2	
6:	72 °C	5'00''
7:	5 °C	5'00''

5. MATERIALI e METODI

Al termine della PCR, gli amplificati sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Per preparare la miscela di agarosio da versare nell'apposita vaschetta per la corsa elettroforetica è stata pesata, con una bilancia analitica, una quantità adeguata di agarosio (*Agarose electrophoresis grade*, Gibco-BRL) a seconda della concentrazione desiderata del gel che, per la separazione dei prodotti della PCR in questione, è stata del 1,5%. L'agarosio è stato posto in una beuta e sciolto a caldo in tampone Tris-acido acetico-EDTA (TAE) 1X, ottenuto da una diluizione di una soluzione *stock* 50X così composta:

- 41 TAE 50X tris-base 242 g;
- Acido acetico glaciale 57,1 ml;
- EDTA 0,5 M;
- H₂O q. b. a 1 l;
- pH 8

La quantità di tampone TAE 1X in cui sciogliere l'agarosio può essere 35 ml, 75 ml o 100 ml in funzione della grandezza della vaschetta utilizzata per la corsa elettroforetica, che a sua volta dipende dal numero dei campioni da analizzare. Una volta sciolto l'agarosio (ad esempio per qualche minuto in forno a microonde), è stato aggiunto bromuro di etidio (sotto cappa) alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml. La miscela è stata infine colata nell'apposita vaschetta dotata di pettine per la formazione di pozzetti e lasciata solidificare per 20 minuti circa.

Una volta solidificato, il gel risulta pronto per essere collocato nell'apposito apparato elettroforetico. Come *running buffer* per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone TAE 1X, con il quale si è riempita la cella fino a superare completamente il livello superiore del gel di agarosio, compresi i pozzetti una volta tolto il pettine.

Come *standard* di riferimento per la valutazione della dimensione delle bande di DNA è stato usato il 100 bp PLUS (VIVANTIS), che comprende bande in un *range* fra 100 e 3000 paia di basi

5. MATERIALI e METODI

(bp). La soluzione *stock* di blu di bromo fenolo (6X) è composta da blu di bromo fenolo allo 0.25% e da saccarosio al 40%, il tutto disciolto in acqua. Il blu di bromo fenolo serve per visualizzare il campione durante il caricamento nei pozzetti e per monitorare l'andamento della corsa elettroforetica, migrando come una banda da 300 pb; il saccarosio serve per aumentare la densità del campione facilitandone la deposizione nel pozzetto. I campioni sono stati caricati all'estremità catodica e durante la corsa elettroforetica, effettuata al voltaggio costante di 80 Volt per circa 45 minuti, sono migrati verso l'anodo.

Al termine della corsa, le bande separate sul gel sono state visualizzate al transilluminatore UV. Il *pattern* di amplificazione visualizzato è stato quindi esaminato per ricavare la positività o meno dei campioni in esame, in base al profilo delle relative bande, in reazione sia allo *standard* di bp, sia ai relativi controlli positivi e negativo. Per verificare con sicurezza l'identità dei prodotti, nella fase di messa a punto del protocollo si è proceduto anche alla purificazione e al sequenziamento degli amplificati ottenuti.

7.5 Proteomica per il rilevamento della proteina PBP2a

È stata eseguita anche la valutazione proteomica dei ceppi in esame per il rilevamento della presenza della proteina PBP2a, in collaborazione con la prof.ssa Gabriella Tedeschi e la dr.ssa Nerea Cuevas della Sezione di Biochimica e Fisiologia, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Degli Studi di Milano.

È stato preparato un *pellet* di cellule batteriche in Eppendorf da 1 ml per ogni ceppo stafilococcico. Per ogni ceppo è stata prelevata una colonia da coltura pura su agar sangue ed è stata stemperata in una provetta contenente 20 ml di Tryptone Soya Broth (Oxoid, Italia). Ogni ceppo è stato

5. MATERIALI e METODI

incubato alla temperatura di 37°C fino al raggiungimento di una densità cellulare pari a circa 24×10^8 UFC.

Le provette sono state poi centrifugate a 6.000 giri per 15 minuti, è stato scartato il brodo surnatante e il *pellet* di cellule batteriche formate è stato sottoposto a 5 trattamenti di lavaggio con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e successiva centrifugazione. Il *pellet* finale è stato inviato per la processazione presso il laboratorio dell'Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Degli Studi di Milano.

Le cellule di *Staphylococcus* sono state lisate mediante l'aggiunta di *sample buffer*, senza blu di bromo fenolo, né β -mercaptoetanololo.

Il contenuto proteico è stato determinato tramite il metodo Bradford.

ELETTROFORESI IN GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS (SDS-PAGE) - L'elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide è stata eseguita in presenza di SDS con mini gel al 10%, 10 x 7 x 0,75 cm (Bio-Rad) con un voltaggio di 80 Volts ed un amperaggio di 20 mA per gel mantenuto costante per tutto l'esperimento.

I campioni da analizzare tramite elettroforesi sono stati denaturati alla temperatura di 100 °C per 3 minuti e centrifugati a 9000 rpm per 30 secondi.

Il gel di impaccamento è stato versato sopra il gel di separazione. Subito dopo, è stato inserito un pettine nello spessore del gel stesso, in modo che durante la polimerizzazione si formassero i pozzetti necessari per caricare i campioni.

Al termine di tali operazioni i campioni sono stati caricati nei pozzetti con l'ausilio di una siringa. È stata riempita la cella elettroforetica con il tampone di corsa e sono stati collegati gli elettrodi ad un generatore. La corsa è stata effettuata a temperatura ambiente, a un voltaggio costante di 80

5. MATERIALI e METODI

Volt e un amperaggio di 20 mA per gel per circa un'ora. Le proteine usate come *standard* di peso molecolare sono state le seguenti:

- fosforilasi b (97400);
- albumina da siero bovino (BSA) (66200);
- ovalbumina (42699);
- anidrasi carbonica (31000);
- inibitore della tripsina (21500);
- lisozima (14400).

WESTERN BLOTTING - Dopo la normale corsa elettroforetica il gel è stato in tampone 25mM Tris base e 192mM Glicina utilizzando un apparecchio Biorad ed applicando un amperaggio costante pari a 100 mA per 2 ore . La membrana di nitrocellulosa è stata immunocolorata secondo la metodica descritta nella sezione "immunocolorazione".

IMMUNOCOLORAZIONE – Sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- **BLOCKING**: la membrana di nitrocellulosa su cui è avvenuto l'*elettroblotting* è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente sotto agitazione in TBS2-T 0.05 % (Tris-buffered saline-Tween) e 6% latte (6 g/100 ml) in modo da saturare i siti di legame non specifici nella membrana.

TBS2-T: 50mM Tris, 150mM NaCl con lo 0.05 % (V/V) di Tween e portato a pH 7 con HCl.

- **LAVAGGIO**: la membrana è stata lavata 1 volta per 15 minuti seguito da 2 lavaggi, da 5 minuti ognuno, in TBS2-T 0.05% (Tris-buffered saline-Tween).
- **ANTICORPO PRIMARIO**: l'anticorpo anti-pbp2a (anticorpo monoclonale di topo, SCIPAC, Inghilterra) è stato diluito 1:20000 in una soluzione di 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*)

5. MATERIALI e METODI

sciolta in TBS2-T 0.05 %. La membrana è stata incubata nella soluzione per 1 ora a temperatura ambiente sotto agitazione.

- **LAVAGGIO:** sulla membrana è stato effettuato un lavaggio della durata di 15 minuti, seguito da 4 lavaggi, da 5 minuti ciascuno, con TBS2-T 0.05%.
- **ANTICORPO SECONDARIO:** la membrana è stata incubata con anticorpo secondario (che riconosce la porzione non specifica degli anticorpi primari ed è coniugato con l'enzima HRP - *Horseradish peroxidase*) diluito 1:20000 in una soluzione di 1% BSA sciolta in TBS2-T 0.05%. La membrana è stata messa a contatto con questa soluzione per 1 ora a temperatura ambiente sotto agitazione.
- **LAVAGGIO:** sulla membrana è stato effettuato un lavaggio della durata di 15 minuti, seguito da 4 lavaggi, da 5 minuti ciascuno, in TBS-T 0.05% .

A questo punto la membrana è stata sviluppata in camera oscura secondo la metodica descritta nella sezione "elettrochemiluminescenza (ECL)".

ELETTROCHEMILUMINESCIENZA (ECL) - Dopo immunocolorazione il metodo di rivelazione utilizzato è stato l'*ECL detection*, che si basa sull'emissione di luce non radioattiva per il rilevamento di antigeni immobilizzati legati ad anticorpi.

ANALISI DELLE LASTRE - Al termine dello sviluppo si è ottenuta un'immagine digitale delle lastre fotografiche per mezzo di uno *scanner* GS-800 (Biorad). Le immagini così ottenute sono state analizzate con il *software* Quantity One (Biorad).

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

6.1 Identificazione biochimica dei ceppi

I 36 ceppi di *Staphylococcus* sono stati identificati preliminarmente con il sistema biochimico miniaturizzato API-Staph®. I risultati sono riassunti nella Tab. 6.1-1.

CEPPO	Codice identificativo API-Staph®	% ID ¹	Identificazione biochimica
1	6732052	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
2	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
3	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
4	6732141/50	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
5	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
6	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
7	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
8	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
9	6712012	58.6 31.2 5.7	<i>S. hominis</i> <i>S. chromogenes</i> <i>S. lugdunensis</i>
10	2632011	98.3	<i>S. haemolyticus</i>
11	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
12	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
13	6732052	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
14	6732052	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
15	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
16	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
17	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
18	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
19	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
20	6732552	99.8	<i>S. xylosus</i>
21	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
22	6532113	92.0	<i>S. simulans</i>
23	6712052	45.5 36.9 10.9	<i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. chromogenes</i>
24	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

25	6712153	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
26	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
27	6730053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
28	6730052	30.2 27.0 24.5	<i>S. xylosus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. hominis</i>
29	6730052	30.2 27.0 24.5	<i>S. xylosus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. hominis</i>
30	6730053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
31	6732053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
32	6712053	-	<i>S. pseudintermedius</i> ²
33	6512113	63.0 18.5 9.3	<i>S. simulans</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. hominis</i>
34	6552151	97.1	<i>S. simulans</i>
35	6512053	57.0 39.6 3.0	<i>S. hyicus</i> <i>S. simulans</i> <i>S. chromogenes</i>
36	6512052	53.0 18.8 13.2	<i>S. simulans</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. chromogenes</i>

Tab. 6.1-1: Risultati dell'identificazione con API-Staph[®].

¹ Percentuale della probabilità di identificazione corretta del ceppo in ordine decrescente.

² Da APIwebTM: Possibilità di *S. pseudintermedius* se di origine veterinaria.

La prevalenza di ceppi di *S. pseudintermedius* identificati con il kit API-Staph[®] (Bio-Mérieux, Francia) corrisponde al 52,8% dei ceppi totali, ma vi è il 36,1% dei ceppi con una percentuale di probabilità di un'identificazione corretta inferiore al 60%, quindi non affidabile. L'ostacolo incontrato durante l'identificazione fenotipica dei ceppi di stafilococchi è imputabile al fatto che i sistemi API sono sistemi biochimici creati per l'identificazione di ceppi di origine umana ed il relativo *database* delle caratteristiche biochimiche dei ceppi di origine veterinaria è limitato. L'identificazione degli stafilococchi animali, e in particolare dei coagulasi-negativi (CoNS), risulta quindi difficile per la bassa probabilità che il ceppo suggerito dal *database* (APIwebTM) sia quello corretto (la percentuale d'identificazione deve essere > 80%) (Cunha, 2004; Park, 2011). Inoltre alcune caratteristiche biochimiche mostrano una variabilità clonale tale da dare, dopo successive subcolture, un accumulo di varianti fenotipiche rispetto ai ceppi di origine che riducono la possibilità di identificare gli stafilococchi (Kloos, 1994).

6.2 Identificazione con metodo molecolare

La tabella 6.2-1 mostra i risultati dell'identificazione definitiva dei 36 ceppi effettuata con analisi HRM. La figura 6.2-1 presenta le curve di *melt* normalizzate.

CEPPO	IDENTIFICAZIONE CON HRM
1	<i>S. pseudintermedius</i>
2	<i>S. pseudintermedius</i>
3	<i>S. pseudintermedius</i>
4	NI
5	<i>S. pseudintermedius</i>
6	<i>S. pseudintermedius</i>
7	<i>S. pseudintermedius</i>
8	<i>S. pseudintermedius</i>
9	<i>S. pseudintermedius</i>
10	NI
11	<i>S. pseudintermedius</i>
12	<i>S. pseudintermedius</i>
13	<i>S. pseudintermedius</i>
14	<i>S. pseudintermedius</i>
15	<i>S. pseudintermedius</i>
16	<i>S. pseudintermedius</i>
17	<i>S. pseudintermedius</i>
18	<i>S. pseudintermedius</i>

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

19	<i>S. pseudintermedius</i>
20	NI
21	<i>S. pseudintermedius</i>
22	NI
23	<i>S. pseudintermedius</i>
24	<i>S. pseudintermedius</i>
25	<i>S. pseudintermedius</i>
26	<i>S. pseudintermedius</i>
27	<i>S. pseudintermedius</i>
28	<i>S. pseudintermedius</i>
29	<i>S. pseudintermedius</i>
30	<i>S. pseudintermedius</i>
31	<i>S. aureus</i>
32	<i>S. pseudintermedius</i>
33	<i>S. pseudintermedius</i>
34	<i>S. pseudintermedius</i>
35	<i>S. pseudintermedius</i>
36	<i>S. pseudintermedius</i>

Tab. 6.2-1: Identificazione dei ceppi con analisi HRM. NI: non identificato

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

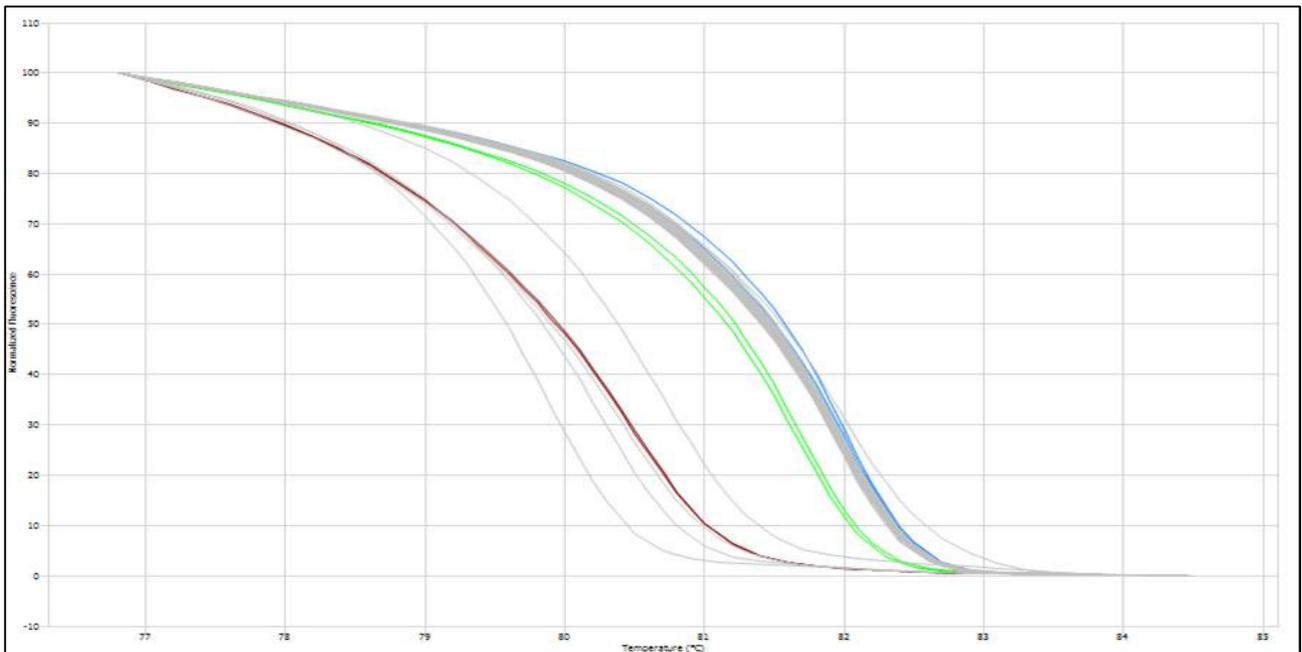


Fig. 6.2-1: Curve normalizzate di *melt* dell'analisi HRM per i 36 ceppi di *Staphylococcus*. Le curve colorate sono quelle degli standard: rossa per *S. aureus*, verde per *S. hyicus*, blu per *S. pseudintermedius*. Si notano le curve dei 4 ceppi di specie diverse, che si distaccano dalle altre.

I risultati ottenuti con l'analisi molecolare mostrano la prevalenza tra i 36 ceppi testati di ceppi di *S. pseudintermedius* (31 ceppi su 36, pari all'86,1%) rispetto ad altre specie (5 su 36, pari al 13,8%) di stafilococchi. Questa maggioranza di isolamenti di *S. pseudintermedius* nei piccoli animali e in particolare nel cane è in accordo con la letteratura (**Sasaki, 2007**) ed era stata già prevista dalla preliminare identificazione con API-Staph®, ma in modo approssimativo, avendo individuato una prevalenza di ceppi di *S. pseudintermedius* del solo 52,8% sul totale. Questi risultati confermano come preferibili, o comunque i soli in grado di fornire un risultato definitivo, i metodi molecolari rispetto ai metodi biochimici. La biologia molecolare è più affidabile per l'identificazione dei ceppi di stafilococchi rispetto ai metodi biochimici in genere (**Shittu, 2006; Jousson, 2006; Ruegg, 2009**), permettendo di ricorrere a sistemi poco costosi (spesso più economici degli stessi sistemi biochimici), senza doversi affidare necessariamente al sequenziamento, col rischio di un approccio più costoso e lungo del necessario.

6.3 *Pattern* di sensibilità antibiotica e multiresistenza

Per la valutazione del *pattern* di sensibilità dei diversi ceppi sono stati scelti antibiotici appartenenti a varie classi, tra i più utilizzati nella pratica clinica veterinaria: penicilline, cefalosporine, aminoglicosidi, lincosamidi, tetracicline, fluorchinoloni, sulfamidico e trimetoprim. La tabella 6.3-1 riassume il risultato degli antibiogrammi effettuati.

È stato osservato un numero elevato di ceppi multiresistenti (ovvero resistenti ad almeno quattro diverse classi di antibiotici), per un totale 18 ceppi su 36, pari al 50% degli stafilococchi raccolti. I ceppi multiresistenti sono i numeri 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 15, 18, 19, 21, 23, 28, 29, 34, 35, 36. Quasi tutti i ceppi multiresistenti rilevati, in prevalenza *S. pseudintermedius*, sono risultati essere anche meticillino-resistenti (ovvero 16 ceppi su 18, pari al 72,8%) (**Tab. 6.3-4 e 6.3-5**). La multiresistenza è una caratteristica di frequente riscontro nei ceppi MRSP (*S. pseudintermedius* meticillino-resistente), che tendono a manifestare resistenza a tutti gli agenti antimicrobici utilizzati nella *routine* clinica dei piccoli animali (**Perreten, 2010; Paul, 2011; Couto, 2011; Guardabassi, 2011**). Anche tra i meticillino-sensibili sono stati rilevati ceppi multiresistenti e va aggiunto che, ad esclusione di 2 ceppi (ovvero i ceppi 2 e 15), tutti gli altri sono risultati resistenti ad almeno 3 molecole antibiotiche tra quelle testate.

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

CEPPO	AML	AMC	CL	CN	DA	DO	ENR	MAR	SXT	MET	VAN
1	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S
2	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S
3	R	R	I	S	R	S	S	S	R	R	S
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
6	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
7	R	S	I	R	R	S	S	S	R	R	S
8	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S
10	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S
11	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
13	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S
14	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
15	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S
16	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
17	R	R	R	S	R	S	S	S	R	I	S
18	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
19	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S
20	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
21	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S
22	S	S	S	I	S	S	R	S	R	S	S
23	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S
24	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
26	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
27	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
28	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
29	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
30	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S
31	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
32	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
33	R	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S
34	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	S
35	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
36	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S

Tab. 6.3-1: *Pattern* di sensibilità dei ceppi in esame. AML amoxicillina, AMC amoxicillina + acido clavulanico, CL cefalessina, CN gentamicina, DA clindamicina, DO doxiciclina, ENR enrofloxacin, MAR marbofloxacin, SXT sulfamidico + trimetoprim, MET meticillina, VAN vancomicina. S sensibile, I intermedio, R resistente.

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

Gli antibiotici a cui si è notata una resistenza di oltre il 50% dei ceppi sono risultati essere amoxicillina (84%), amoxicillina associata ad acido clavulanico (58%), clindamicina (61%), sulfamidico associato a trimetoprim (61%). Una resistenza del 40% circa del numero totale dei ceppi si è osservata per cefalessina (47%), gentamicina (44%) ed enrofloxacin (42%). Attorno al 25-30% sono stati i ceppi resistenti a doxiciclina (28%) e marbofloxacin (33%) (**Tab.6.3-2** e **Grafico 6.3-1**).

	AML	%	AMC	%	CL	%	CN	%	DA	%	DO	%	ENR	%	MAR	%	SXT	%
R	30	84	21	58	17	47	16	44	22	61	10	28	15	42	12	33	22	61
I	3	8	0	0	2	6	1	3	0	0	4	11	0	0	1	3	0	0
S	3	8	15	42	17	47	19	53	14	39	22	61	21	58	23	64	14	39

Tab. 6.3-2: Resistenze antibiotiche dei ceppi di *Staphylococcus* valutati. AML amoxicillina, AMC amoxicillina + acido clavulanico, CL cefalessina, CN gentamicina, DA clindamicina, DO doxiciclina, ENR enrofloxacin, MAR marbofloxacin, SXT sulfamidico + trimetoprim, MET meticillina, VAN vancomicina. S sensibile, I intermedio, R resistente

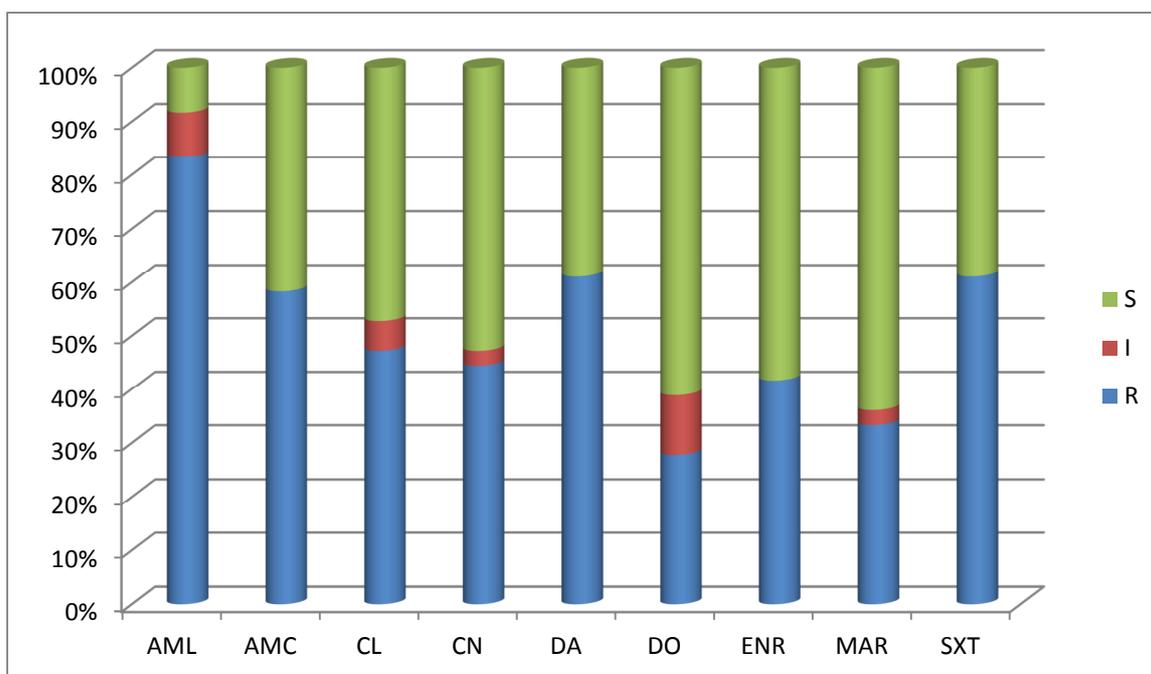


Grafico 6.3-1

Risposta dei ceppi alla meticillina	N°	%
Sensibili	12	33,34
Intermedi	2	5,55
Resistenti	22	61,11

Tab. 6.3-3: Ceppi meticillino-sensibili, meticillino-intermedi e meticillino-resistenti.

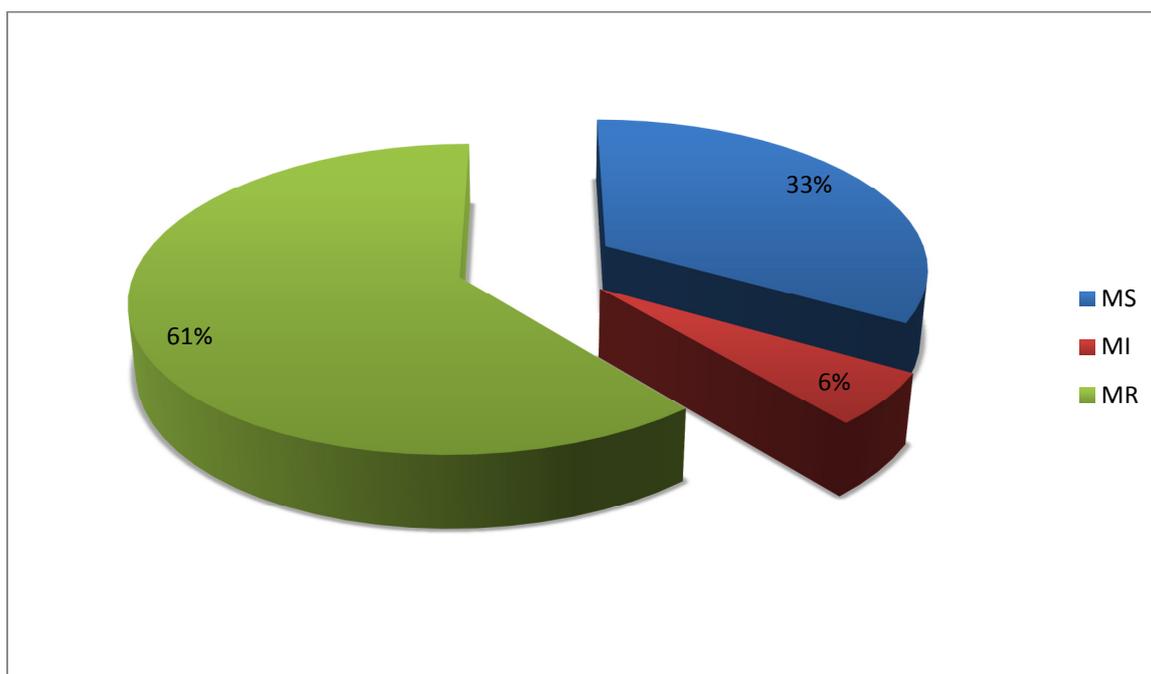


Grafico 6.3-2

	N°	%
Ceppi MR multiresistenti	16	72,8
Ceppi MR non multiresistenti	6	27,2
Tot.	22	100

Tab. 6.3-4: Ceppi meticillino-resistenti risultati multiresistenti o non multiresistenti all'antibiogramma.

	N°	%
Ceppi MS multiresistenti	2	16,7
Ceppi MS non multiresistenti	10	83,3
Tot.	12	100

Tab. 6.3-5: Ceppi meticillino-sensibili risultati multiresistenti o non multiresistenti all'antibiogramma.

CEPPI	Resistenti a un fluorchinolone	% su 36 ceppi	Sensibili ai fluorchinoloni	% su 36 ceppi
Meticillino-resistenti	13	36,1	11	30,6
Meticillino-sensibili	4	11,1	8	22,2
Tot.	17	47,2	19	52,8

Tab. 6.3-6: Prevalenza tra i ceppi MRS e MSS della resistenza ai fluorchinoloni. Sono stati inseriti tra i ceppi resistenti anche quelli che hanno mostrato una resistenza intermedia ai fluorchinoloni in sede di antibiogramma.

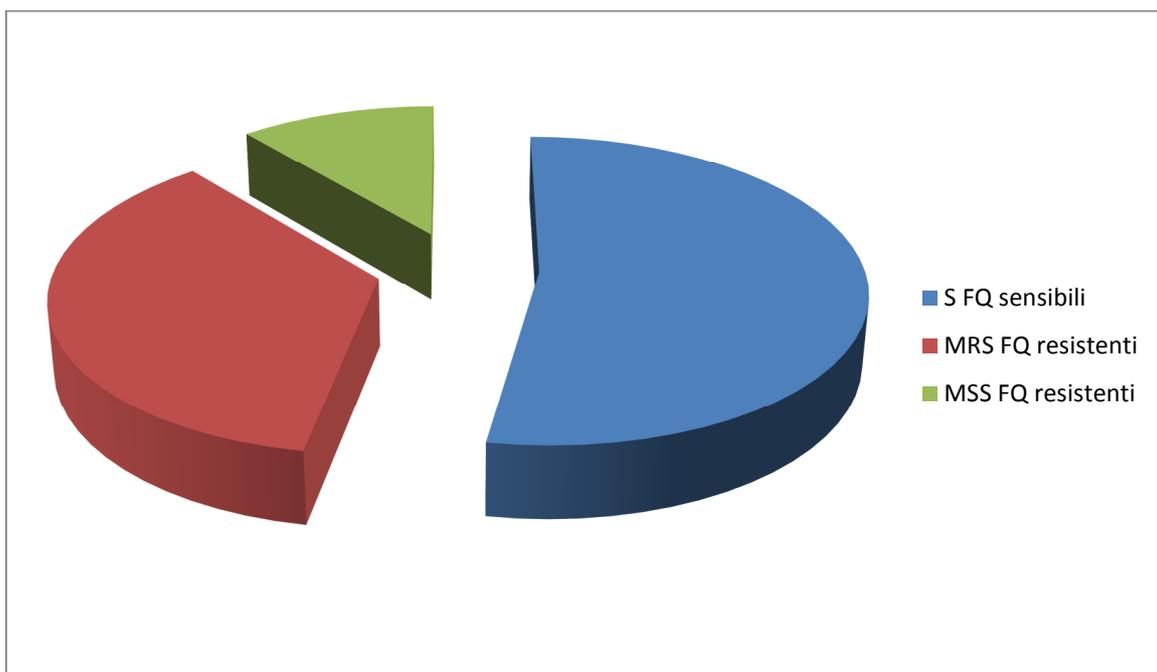


Grafico 6.3-3

La prevalenza dei ceppi resistenti ai fluorchinoloni (FQ) si è avuta, in accordo con la letteratura (Guardabassi, 2011), tra i ceppi meticillino-resistenti, con 13 ceppi (pari al 36,1% del totale degli stafilococchi) rispetto ai 4 ceppi fluorchinolone-resistenti rilevati tra i meticillino-sensibili (11,1%

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

su 36 ceppi) (**Tab. 6.3-6 e Grafico 6.3-3**). A questi rilevamenti si aggiungono i risultati della valutazione del gruppo di 6 ceppi di *S. pseudintermedius* (5, 6, 7, 19, 23, 25) nei quali sono stati ricercati i geni *gyrA* e *gria* per la resistenza ai fluorochinoloni. Di seguito sono riportati i risultati di antibiogrammi (**Tab. 6.3-7**), MIC (**Tab. 6.3-8**) e PCR (**Tab. 6.3-9**)

CEPPO	Enrofloxacin	Marbofloxacin
5	Resistente	Resistente
6	Sensibile	Sensibile
7	Sensibile	Sensibile
19	Resistente	Resistente
23	Resistente	Sensibile
25	Sensibile	Sensibile

Tab. 6.3-7: Risultati dell'antibiogramma per enrofloxacin e marbofloxacin sui ceppi selezionati.

CEPPO	MIC Enrofloxacin	MIC Marbofloxacin
5	62,5 µg/ml	32 µg/ml
19	62,5 µg/ml	32 µg/ml
23	0,5 µg/ml	// *

Tab. 6.3-8: Valori di MIC ottenuti per enrofloxacin e marbofloxacin nei ceppi risultati resistenti a uno o a entrambi gli antibiotici all'antibiogramma.

*Non testato perché sensibile a marbofloxacin all'antibiogramma.

Tra i 6 ceppi di *S. pseudintermedius* testati 2 (ceppi 5 e 19) sono risultati resistenti ad enrofloxacin e marbofloxacin, 3 (ceppi 6, 7 e 25) sono risultati sensibili ad entrambi i fluorochinoloni ed un

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

ceppo (23) ha manifestato resistenza all'enrofloxacin e sensibilità alla marbofloxacin. I valori di MIC dei ceppi resistenti rispettivamente ad enrofloxacin e marbofloxacin sono stati confrontati con i valori di riferimento del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), corrispondenti per entrambi gli antibiotici, sia nel cane che nel gatto, a MIC $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ (ceppi sensibili), 1-2 $\mu\text{g/ml}$ (ceppi a sensibilità intermedia) e ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ (ceppi resistenti) (CLSI 2008a).

CEPPO	Meticillina	Enrofloxacin	Marbofloxacin	<u>GyrA</u>	<u>GrlA</u>	<i>mecA</i>
				Posizione Ser84	Posizione Ser80	
5	Resistente	Resistente	Resistente	Mutato	Mutato	+
6	Resistente	Sensibile	Sensibile	Non mutato	Non mutato	+
7	Resistente	Sensibile	Sensibile	Mutato	Non mutato	+
19	Resistente	Resistente	Resistente	Mutato	Mutato	+
23*	Resistente	Resistente	Sensibile	Non mutato	Mutato	-
25*	Resistente	Sensibile	Sensibile	Non mutato	Non mutato	-

Tab. 6.3-9: Mutazioni in *GyrA* e *GrlA* nei sei ceppi valutati e sensibilità ai due fluorochinoloni testati e alla meticillina; presenza del gene *mecA*.

*Ceppi 23 e 25: resistenza *borderline* alla meticillina, quindi privi del gene *mecA*.

L'allineamento delle sequenze nucleotidiche ha mostrato un accordo completo con le sequenze attese per i geni *gyrA* e *grlA* di *S. pseudintermedius*, confermando quindi la valutazione fenotipica. I ceppi fluorochinolone-resistenti hanno presentato tutti una mutazione da Ser a Leu al codone 84 per *gyrA* e da Ser a Phe al codone 80 per *grlA* (Kaatz, 1993; Kaatz, 1997; Hooper, 2002; Takahashi,

1998). I ceppi sensibili ai due fluorchinoloni non hanno mostrato una mutazione nella stessa posizione.

6.4 RILEVAMENTO DEL GENE *mecA* E MIC PER METICILLINA E VANCOMICINA

Nella tabella 6.4-1 è indicata la sensibilità dei diversi ceppi alla meticillina con i relativi risultati della PCR per il rilevamento del gene *mecA*. Tra i ceppi meticillino-resistenti 4 ceppi (10, 23, 25, 30) hanno presentato una resistenza *borderline*, in quanto caratterizzati da meticillino-resistenza fenotipica ma privi del gene *mecA* (Tab. 6.4-2). Sono classificabili come BORS (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus*) poiché resistenti alle penicilline (amoxicillina, meticillina) ma sensibili a queste quando viene aggiunto un inibitore delle β -lattamasi, nel nostro caso l'acido clavulanico. I valori di MIC di questi ceppi (tra 2 e 4 $\mu\text{g/ml}$) (Keseru, 2011) confortano questo rilevamento (Tab. 6.4-2).

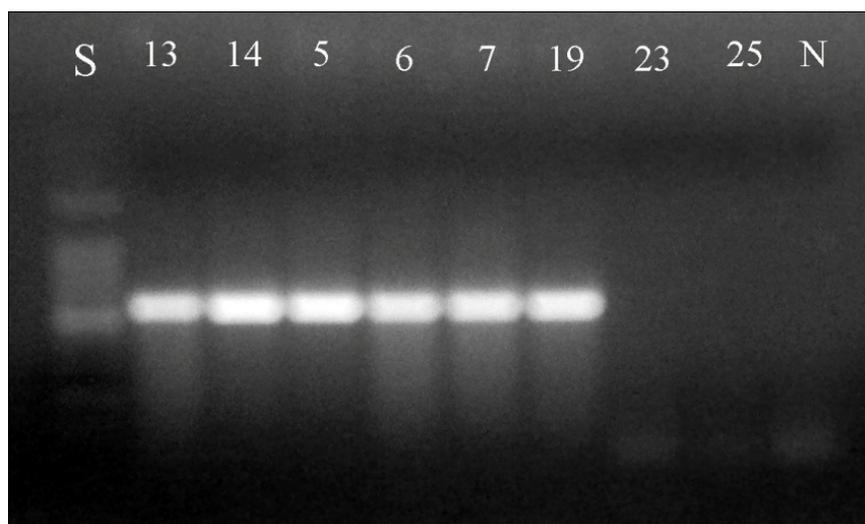


Fig. 6.2-2: Esempio del risultato di una corsa su gel di agarosio per il rilevamento del gene *mecA*. In alto i numeri dei ceppi testati: 13, 14, 5, 6, 7, 19, 23, 25; S: *standard*; N: controllo negativo.

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

CEPPO	MIC meticillina (µg/ml)	Esito AB meticillina	<i>Borderline</i>	<i>mecA</i>
1	125	Resistente		+
2	2	Sensibile		-
3	32	Resistente		+
4	62,5	Resistente		+
5	> 500	Resistente		+
6	8	Resistente		+
7	8	Resistente		+
8	2	Sensibile		-
9	4	Resistente		+
10	2	Intermedio	<i>Borderline</i>	-
11	2	Sensibile		-
12	2	Sensibile		-
13	500	Resistente		+
14	32	Resistente		+
15	2	Sensibile		-
16	2	Sensibile		-
17	32	Intermedio		+
18	500	Resistente		+
19	8	Resistente		+
20	8	Sensibile		-
21	>500	Resistente		+
22	2	Sensibile		-
23	2	Resistente	<i>Borderline</i>	-
24	16	Sensibile		-
25	2	Resistente	<i>Borderline</i>	-
26	4	Sensibile		-
27	0,5	Sensibile		-
28	>500	Resistente		+
29	500	Resistente		+
30	2	Resistente	<i>Borderline</i>	-
31	32	Resistente		-
32	>500	Resistente		-
33	2	Sensibile		-
34	2	Resistente		+
35	62	Resistente		+
36	62	Resistente		+

Tab. 6.4-1: Sensibilità dei ceppi di stafilococco alla meticillina e relativi valori di MIC, in relazione alla presenza o assenza del gene *mecA*.

Ceppo <i>borderline</i>	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>mecA</i>
10	2	negativo
23	2	negativo
25	2	negativo
30	2	negativo

Tab. 6.4-2: Ceppi *borderline* e relativi valori di MIC.

Il gene *mecA* è stato rilevato in 18 ceppi (50% di 36 ceppi) tra quelli risultati resistenti alla meticillina all'antibiogramma (61,11% di 36 ceppi).

È stata riscontrata inspiegabilmente l'assenza del gene *mecA* in 2 ceppi (31 e 32, vedasi **Tab. 6.4-1**) per i quali l'antibiogramma aveva dato esito di resistenza alla meticillina e i valori di MIC sono risultati troppo elevati (rispettivamente di 32 e $>500 \mu\text{g/ml}$) per supporre che si tratti di ceppi *borderline*.

Non è stato individuato nessun ceppo vancomicino-resistente tra i 36 raccolti. Si è proceduto comunque alla valutazione dei valori di MIC per tutti i ceppi raccolti (**Tab. 6.4-3**), anche se risultati sensibili alla vancomicina all'antibiogramma.

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

CEPPO	MIC vancomicina ($\mu\text{g/ml}$)
1	2
2	<1
3	<1
4	2
5	<1
6	<1
7	<1
8	<1
9	<1
10	<1
11	<1
12	<1
13	<1
14	<1
15	<1
16	<1
17	<1
18	<1
19	<1
20	<1
21	<1
22	<1
23	<1
24	<1
25	<1
26	<1
27	<1
28	2
29	<1
30	<1
31	<1
32	2
33	<1
34	<1
35	<1
36	<1

Tab. 6.4-3: I valori di MIC di *Staphylococcus* per la vancomicina sono: sensibile se ≤ 2 , intermedio se tra 4 e 8, resistente se ≥ 16 .

6.5 PROTEOMICA

Sono stati testati per la presenza di PBP2a 19 ceppi dei 36 raccolti ed i risultati sono stati completamente sovrapponibili alle previsioni fatte in base ai precedenti risultati di antibiogramma e MIC (Fig. 6.5-1 e 6.5-2).

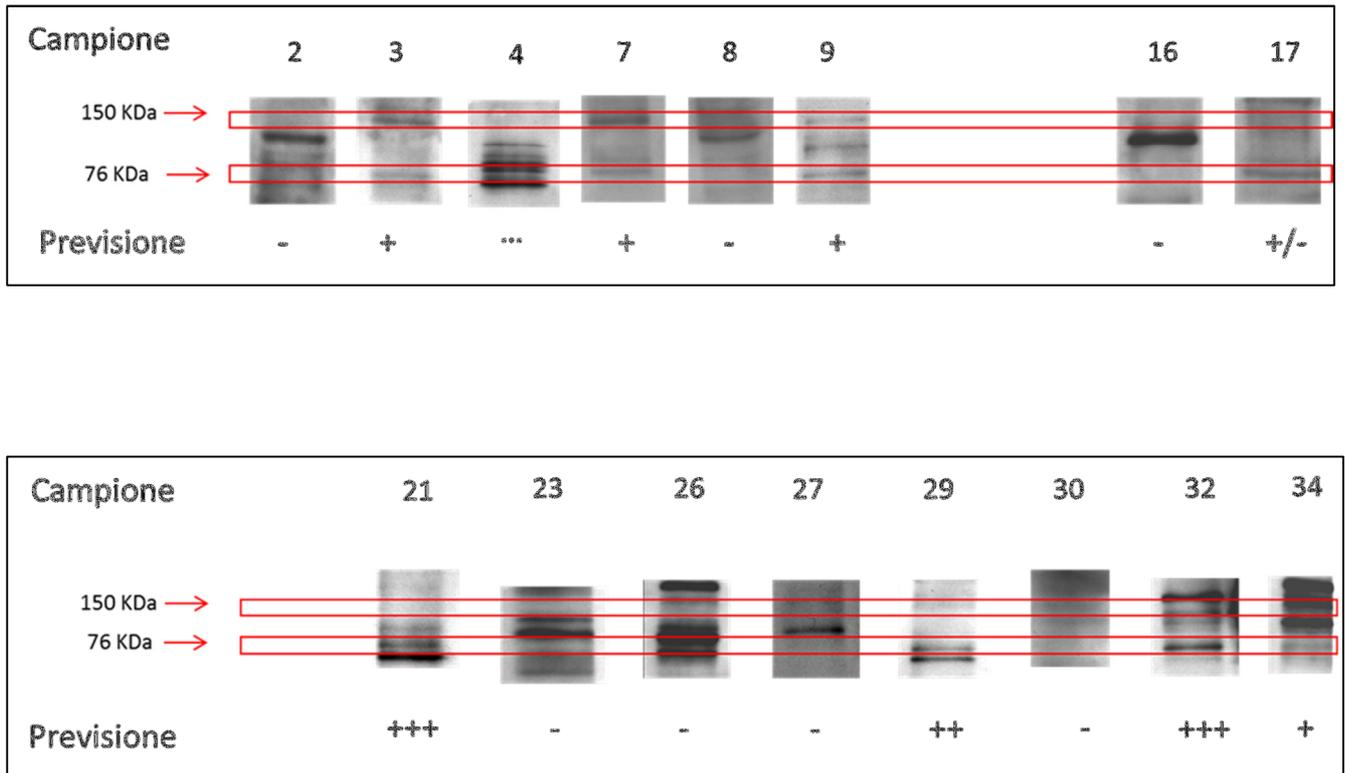
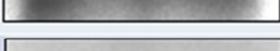


Fig. 6.5-1: Rilevamento della proteina PBP2a diversamente espressa nei ceppi testati.

L'espressione della proteina PBP2a, responsabile della resistenza completa alla meticillina ed ai β -lattamici β -lattamasi resistenti, è risultata, come previsto, direttamente proporzionale al grado di resistenza del ceppo di *Staphylococcus*, in relazione al valore di MIC ottenuto per i diversi ceppi.

6. RISULTATI e DISCUSSIONE

Campione	Previsione	Adj. Vol	Immagine
2	-	0,00	
3	+	0,15	
4	...	0,07	
7	+	0,11	
8	-	0,00	
9	+	0,12	
12	-	0,00	
14	+	0,14	
16	-	0,00	
17	+/-	0,27	
18	++	0,11	
21	+++	0,41	

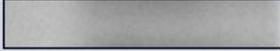
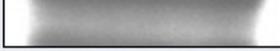
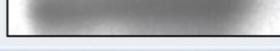
Campione	Previsione	Adj. Vol	Immagine
23	-	0,00	
26	-	0,00	
27	-	0,00	
29	++	0,35	
32	+++	0,41	
34	+	0,14	

Fig. 6.5-2: Quantità di proteina PBP2a ottenuta, in relazione alle previsioni effettuate per i singoli ceppi, e relative immagini.

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

La specie coagulasi-positiva di maggior interesse nella clinica degli animali da compagnia è *S. pseudintermedius*. In accordo con la letteratura (**Hoekstra, 2002; Hartmann, 2005; Cox, 2008**) la nostra ricerca ha rilevato una netta prevalenza di *S. pseudintermedius* negli isolati clinici di cane e, in minor numero, di gatto rispetto all'isolamento di altre specie stafilococchi (coagulasi-positive o coagulasi-negative).

Il ridotto numero di ceppi isolati da felini rispetto a quelli di origine canina ha sicuramente, nel presente lavoro, una componente di distorsione del campione legata alla prevalente affluenza al nostro laboratorio di campioni clinici prelevati da cani e in numero più limitato da gatti. Questo dato concorda con la recente letteratura (**Woolley, 2007; Abraham, 2007; Kadlec, 2010**) che indica un ridotto isolamento di stafilococchi, in particolare di *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, da campioni di origine felina, ipotizzando che la causa potrebbe essere rappresentata da una ridotta capacità di aderenza di questi stafilococchi ai corneociti felini rispetto a quelli canini o umani. Questo può spiegare in parte perché le infezioni cutanee superficiali da stafilococchi siano meno comuni nel gatto se comparate a quelle nel cane e nell'uomo (**Woolley, 2007**).

La nostra valutazione della meticillino-resistenza concorda con il *trend* in ascesa della diffusione dei ceppi MRS, in particolare di *S. pseudintermedius*, negli animali d'affezione (cane e gatto). L'isolamento dei primi ceppi MRSP nel cane e nell'uomo è stato riportato negli Stati Uniti nel 1999 e da allora la diffusione di MRSP è stata in costante aumento. La prevalenza di MRSP tra i ceppi clinici isolati di *S. pseudintermedius* è variabile tra il 4 e il 66% in relazione alla nazione. Secondo i dati pubblicati negli ultimi due anni (**Guardabassi, 2011**) è stato rilevato il 66% di MRSP in Giappone, il 34% in Corea, il 30% negli Stati Uniti, il 21% in Italia (**De Lucia, 2011**), il 16% in Brasile,

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

il 12% in Polonia, il 6,2% in Portogallo (**Couto, 2011**), il 6% in Germania, il 4% in Svezia. Non sono stati riscontrati MRSP in Inghilterra (**Wedley, 2010**).

Lo studio effettuato in Italia presso la Clinica Veterinaria Privata San Marco, Padova (**De Lucia, 2011**) fa riferimento a dati raccolti nel 2010 e la prevalenza di MRSP è stata di 10 ceppi su 48 appartenenti al gruppo di *S. intermedius* (SIG) (21%). I dati del nostro studio, raccolti negli anni 2009-2010 presso la Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, evidenziano una prevalenza maggiore di MRSP rispetto a quello studio, con 31 ceppi su 36 (86,1%). In accordo con quanto affermato nello studio effettuato a Padova, è difficile trarre conclusioni generali sull'attuale situazione italiana relativamente alla prevalenza di ceppi MRSP, in quanto le fonti di raccolta dei campioni ed i metodi di processazione differiscono da un laboratorio all'altro e gli studi per ora sono in numero ridotto. L'unica considerazione per ora concessa è che la prevalenza di MRSP sia elevata rispetto ad altri Paesi europei ed extraeuropei; si può supporre che la motivazione sia l'ampio utilizzo di penicilline e cefalosporine nella terapia dei piccoli animali in Italia (**Guardabassi, 2009**). La prevalenza di MRSP da noi rilevata, confrontata con i rilevamenti effettuati nei vari Paesi, è significativa e preoccupante, considerando il fatto che l'identificazione genotipica di ceppi di *S. pseudintermedius* meticillino-resistenti, con rilevamento del gene *mecA*, in Europa è molto recente (**El Zubeir, 2007**). Inoltre i dati relativi al monitoraggio degli stafilococchi meticillino-resistenti in Italia pubblicati nel 2003 dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana, centro di riferimento per le antibiotico-resistenze in Italia, indicavano la completa assenza di MRSP nel cane (**IZSLT, 2003**). Altri studi recenti hanno rilevato una scarsissima prevalenza del gene *mecA* (4 ceppi su 136 stafilococchi, pari al 3% circa) in altre zone d'Italia (**Meucci, 2010**), facendo riflettere su una possibile diffusione dei ceppi MRS in relazione al bacino d'utenza.

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

Nel presente studio, oltre all'elevata presenza di gene *mecA* (nel 50% dei ceppi), è importante prestare attenzione alla notevole diffusione della multiresistenza tra i ceppi valutati. *S. pseudintermedius* meticillino-resistente è sempre associato ad un alto grado di multiresistenza (Perreten, 2010; Paul, 2011; Couto, 2011; Guardabassi, 2011). L'elevata multiresistenza riscontrata a penicilline e cefalosporine, ma anche ad altri antibiotici (tetracicline, clindamicina, trimetoprim-sulfamidico) concorda con la recente letteratura (Guardabassi, 2011). Un'alta percentuale di resistenza è stata riscontrata anche verso i fluorchinoloni (36,1%) da parte dei ceppi meticillino-resistenti, mentre i ceppi meticillino-sensibili hanno presentato resistenza nel 11,1% dei casi. I ceppi MRSP che si stanno diffondendo in Europa sono caratterizzati da resistenza, come precedentemente detto, a molti principi attivi, tra cui i fluorchinoloni (Guardabassi, 2011), anche in relazione all'aumento dell'impiego dei fluorchinoloni in terapia veterinaria in vari Paesi d'Europa. La prevalenza dell'11,1% dei ceppi MSSP resistenti ai fluorchinoloni è invece un dato da noi rilevato che si discosta in modo significativo dal quadro europeo e statunitense, dove le prevalenze sono di molto inferiori (2% in Polonia, 1% in Danimarca, 0% in Canada, 4% in Tennessee) (Guardabassi, 2011) e che concorda invece con quanto già segnalato in Italia (Guardabassi, 2009) e da noi rilevato in precedenti studi (Radaelli, 2000; Colombo, 2007). Questo dato potrebbe essere legato all'elevato utilizzo nel nostro Paese di queste molecole ad ampio spettro d'azione nella pratica clinica, soprattutto quando le penicilline e affini non si dimostrano efficaci (Guardabassi, 2009; EARSS, 2010).

Per quel che riguarda, invece, i ceppi sensibili alla meticillina, questi mostrano quasi tutti (10 su 12, pari all'83% dei ceppi meticillino-sensibili) buona sensibilità a tutti gli antibiotici testati, così come riportato, in genere, dalla letteratura e da noi già osservato nel 2000 e nel 2007 nel corso di altre sperimentazioni relative alla meticillino-resistenza negli stafilococchi (Radaelli, 2000; Colombo, 2007).

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

La cassetta cromosomica SCCmec legata alla meticillino-resistenza, oltre a contenere il gene *mecA*, può presentare altre sequenze geniche che conferiscono resistenza nei confronti di altri principi attivi. Per questo i ceppi meticillino-resistenti sono spesso caratterizzati da multiresistenza (**Perreten, 2010; Corrà, 2010**). Inoltre, non essendoci linee guida per il trattamento delle infezioni sostenute da MRSP, la scelta dell'antimicrobico da utilizzare in terapia è affidata all'iniziativa del medico veterinario (**Couto, 2011**), con il possibile rischio di approcci terapeutici scorretti, non mirati e di breve durata, con la potenziale conseguenza di sviluppo di ulteriori resistenze antibiotiche. Le opzioni terapeutiche per la cura di infezioni causate da MRSP multiresistente sono molto limitate (tetracicline, cloramfenicolo, rifampicina e nitrofurantoina, che hanno varie controindicazioni nei piccoli animali), ma spesso i ceppi risultano resistenti anche a questi farmaci (**Perreten, 2010; Guardabassi, 2011**). Questa situazione ha indotto alcuni veterinari ad utilizzare antibiotici non autorizzati per uso veterinario e classificati come farmaci di ultima fascia nella terapia di gravi infezioni batteriche nosocomiali, quali la vancomicina ed il linezolid (**Guardabassi, 2011**), con il rischio di indurre resistenza anche alle ultime risorse farmacologiche nella lotta contro gli stafilococchi meticillino-resistenti.

Un numero crescente di studi ha rilevato la presenza di MRSP in veterinari e proprietari di piccoli animali (**Van Hoovel, 2006; Kempker, 2009; Chuang, 2010; Stegmann, 2010; Paul, 2011; Soedarmanto, 2011**). Sebbene l'incidenza delle infezioni da MRSP sia ancora molto bassa nell'uomo, il potenziale zoonosico di questo stafilococco patogeno deve essere valutato con estrema attenzione, anche in considerazione della sua comparsa molto recente. La frequenza di infezioni umane potrebbe essere sottovalutata in quanto esiste un elevato rischio di errore nell'identificazione di MRSP nei laboratori diagnostici di medicina umana. Infatti *S. pseudintermedius* è generalmente negativo alla prova della coagulasi su vetrino, e altre prove di *routine* non sono specifiche per la sua corretta identificazione. Indipendentemente da potenziali

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

rischi zoonosici, veterinari e proprietari di piccoli animali possono fungere da vettori per la trasmissione da animale ad animale di *S. pseudintermedius* e in particolare di MRSP ST71, il clone attualmente prevalente di *S. pseudintermedius* meticillino-resistente nella popolazione canina europea, dotato di multiresistenza estremamente elevata ai farmaci d'uso comune nella pratica clinica veterinaria. Questo elemento è particolarmente importante dal punto di vista epidemiologico visto che MRSP ST71 ha una notevole predisposizione alla contaminazione degli ambienti clinici e alle infezioni nosocomiali (**Guardabassi, 2011**). Inoltre, anche se *S. pseudintermedius* è raramente un agente eziologico primario di patologia nell'uomo, può fungere da *reservoir* per geni che conferiscono diverse resistenze antibiotiche e, una volta acquisito da parte di un portatore umano, è una potenziale fonte di trasmissione di geni di resistenza ad altri stafilococchi umani causanti più frequentemente infezioni nell'uomo, ad esempio proprio *S. aureus*.

Per quanto riguarda la resistenza alla vancomicina il risultato della ricerca di ceppi caratterizzati da vancomicino-resistenza intermedia (VIS) o completa (VRS) è stato negativo. Non è ancora stato effettuato nessun rilevamento, per quanto ci è noto, di stafilococchi VIS e VRS in ambito veterinario. Anche in medicina umana le rilevazioni di ceppi VRSA (*Vancomycin Resistant S. aureus*) non sono numerose, mentre si assiste ad un graduale aumento dei ceppi VISA (*Vancomycin Intermediate S. aureus*) (**Schilling, 2011**). È stata comunque segnalata una ridotta sensibilità ai glicopeptidi nei ceppi di stafilococchi umani meticillino-resistenti (**Appelbaum, 2007**).

Per concludere questo lavoro cito l'intervento fatto dal professor Guardabassi al convegno SIDILV 2011 (Trani, Italia) parlando di *S. pseudintermedius* meticillino-resistente. *“Dal punto di vista della salute animale, questo stafilococco multi-resistente rappresenta il più grave problema di*

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

antibioticoresistenza mai osservato nella storia della medicina veterinaria. Data la sua crescente diffusione e le difficoltà intrinseche nella scelta di una terapia antibiotica efficace e sicura, MRSP ST71 è da considerarsi una vera e propria minaccia alla salute dei piccoli animali. L'uso diffuso di cefalosporine e fluorochinoloni nei piccoli animali è destinato a favorire nei prossimi anni una ulteriore diffusione di MRSP ST71, con conseguenze che potrebbero risultare devastanti sulla salute di questi animali. Il controllo e la prevenzione di MRSP ST71 sono legati a vari fattori quali i) l'implementazione di linee guida nazionali per l'uso razionale e responsabile dell'antibioticoterapia nei piccoli animali; ii) l'adozione di programmi per il controllo dell'infezione nelle strutture veterinarie; ed infine iii) lo sviluppo e l'utilizzazione di prodotti antimicrobici alternativi, quali shampoo ed altri prodotti antisettici ad uso topico. Sebbene i rischi per la salute pubblica appaiano essere limitati allo stato attuale delle nostre conoscenze, veterinari e proprietari di piccoli animali dovrebbero essere sensibilizzati circa il potenziale rischio zoonosico associato alla diffusione di MRSP ST71. Inoltre il personale presso laboratori diagnostici di medicina umana dovrebbe essere addestrato a identificare i ceppi MRSP correttamente al fine di attuare una sorveglianza epidemiologica nell'uomo" (Guardabassi, 2011).

Al fine di proseguire l'osservazione della diffusione di MRSP nella popolazione canina e felina, per monitorare la velocità di aumento del numero di infezioni da ceppi di stafilococchi multi- e meticillino-resistenti, potrebbe essere interessante valutare la diffusione delle diverse specie di stafilococchi nei piccoli animali, con metodi rapidi, precisi ed economici come l'HRM-PCR.

Interessante sarebbe inoltre l'eventuale identificazione del clone MRSP ST71 o di altre linee genetiche di MRSP in animali da compagnia e proprietari/medici veterinari, nell'ambito di uno studio epidemiologico del nostro bacino d'utenza, da confrontare con i dati raccolti in altre zone d'Italia per avere un quadro completo della situazione a livello nazionale.

7. CONSIDERAZIONI e CONCLUSIONI

È infine auspicabile una prosecuzione del monitoraggio dei campioni che afferiscono al nostro laboratorio diagnostico in relazione alla vancomicina-resistenza, per tenere sotto controllo un eventuale sviluppo di resistenza a quello che, per ora, è uno dei rari farmaci ancora efficaci nel controllo delle infezioni da stafilococchi meticillino-resistenti, umani e animali.

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup, F. M. (2001). Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidae gives possible evidence for host specificity and co-evolution of bacteria and hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1343-1347.
- Abraham, J. L., Morris, D. O., Griffeth, G. C., Shofer, F. S., Rankin, S. C. (2007). Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. The Authors. *Journal compilation* 18, 252-259.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 5-16.
- Applebaum, P. C. (2007). Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 398-408.
- Archer, G. L., Niemeier, D. M. (1994). Origin of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiology* 2, 343-347.
- Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F., Courvalin, P. (1993). Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology* 175, 117-127.
- Ashford, P., Bew, S. P. (2011). Recent advances in the synthesis of new glycopeptide antibiotics. *Chemical Society Reviews*, DOI: 10.1039/c1cs15125h.

8. BIBLIOGRAFIA

- Avison, M. B., Bennett, P. M., Howe, R. A., Walsh, T. R. (2002). Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 255-260.
- Barber, D. A., Miller, G. Y., McNamara, P. E. (2003). Models of antimicrobial resistance and foodborne illness: examining assumptions and practical applications. *Journal of Food Protection* 66, 700–709.
- Berger-Bächli, B., Roher, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of Microbiology* 178, 165-171.
- Chambers, H. F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Review* 10 (n°4), 781-791.
- Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., et al. (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *The New England Journal of Medicine* 348, 1342-1347.
- Chiew, Y. F., Yeo, S. F., Hall, L. M. C., Livermore, D. M. (1998). Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, 247-251.
- Chuang, C., Yang, Y., Hsueh, P., Lee, P. (2010). Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1497-1498.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2008a) Performance Standards For Antimicrobial Disk And Dilution Susceptibility Tests For Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard. 3rd edn. CLSI Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute

8. BIBLIOGRAFIA

- Colombo, E.. Prevalenza degli stafilococchi meticillino-resistenti in campioni isolati dal cane: un problema di sanità pubblica? Tesi di laurea in Medicina Veterinaria, a.a. 2006-2007. Relatore: Dr. Martino P. A.
- Corrà, M., Milani, C., Drigo, I., et al. (2010). Isolamento di *Staphylococcus pseudintermedius* meticillino-resistente in cagne fattrici di allevamento. Atti del XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Genova, 27-29 Ottobre 2010, pag. 49-50.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42, 25-34.
- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A., Guardabassi, L. (2011). Prevalence of meticillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record* 169, 72-74.
- Cox, H. U. (2006). Infezioni stafilococciche pag. 51-55 in *Malattie infettive del cane e del gatto*, di Greene, C. E., Elsevier Masson, Milano (2008).
- Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., et al. (2000). Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 2276-2285.
- Cunha, M. L., Sinzato, Y. K., Silveira, L. V. A. (2004). Comparison of methods for the identification of the coagulase-negative staphylococci. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 855-860.
- De Kievit, T. R., Parkins, M. D., Gillis, R. J., et al. (2001). Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemiotherapy*, June, p. 1761-1770.

8. BIBLIOGRAFIA

- De La Fuente, R., Suarez, G., Schleifer, K. H. (1985). *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 35, 99-102.
- De La Maza, L. M., Pezzlo, M. T., Shigei, J. T., Peterson, E. M., (2004). *Atlante a colori di batteriologia medica*, pag. 1-32. Ed. Piccin Nuova Libreria s.p.a, Padova.
- De Lucia, M., Moodley, A., Latronico, F., et al. (2011). Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. *Research in Veterinary Science* 91, 346-348.
- Depardieu, F., Perichon, B., Courvalin, P. (2004). Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5857-5860.
- Devriese, L. A., Hermans, K., Baele, M., Haesebrouck. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology* 133, 206-207: Letter to the Editor.
- Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., et al. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. Nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1569-1573.
- EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), (2003). European antimicrobial resistance surveillance as part of a Community strategy, pag. 77-88.
- EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), (2010). Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2010, pag. 13, 30-32.
- El Zubeir, I. E., Kanbar, T., Alber, J., et al. (2007). Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens

8. BIBLIOGRAFIA

during routine veterinary microbiological examinations. *Veterinary Microbiology* 121, 170-176.

- Faires, M. C., Traverse, M., Tater, K. C., Pearl, D. L., Weese, J. S. (2010). Methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* infections in dogs. *Emerging Infectious Diseases* 16, 69-75.
- Falord, M., Mäder, U., Hiron, A., et al. (2011). Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. *PLoS ONE* 6, 1-17 (e21323).
- Fuda, C. C. S., Fisher, j. f., Mobashery, S. (2005). β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptative resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2617-2633.
- Gemmel, C. G., Dawson, J. E. (1982). Identification of coagulase-negative staphylococci with the API Staph System. *Journal of Clinical Microbiology* 16, 874-877.
- Ghezzi, C. (2011). Antibiotico-resistenza in ceppi batterici isolate da tamponi auricolare di cani con otite: valutazione dell'andamento nell'ultimo decennio. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria.
- Gilbert, P., Das, J., Foley, I. (1997). Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Advances in Dental Research* 11, 160-167.
- Gottlieb, S., Wigney, D. I., Martin, P. A., Norris, J. M., Malik, R., Govendir, M. (2008). Susceptibility of canine and feline *Escherichia coli* and canine *Staphylococcus intermedius* isolates to fluoroquinolones. *Australian Veterinary Journal* 86, 147-152.
- Guardabassi, L. (2011). L'emergenza degli stafilococchi meticillino-resistenti in ambito veterinario: problematiche di sanità pubblica e animale. Atti del XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Trani, 12-14 Ottobre 2011, pag. 44-45.

8. BIBLIOGRAFIA

- Guardabassi, L., Fondati, A. (2009). Uso prudente e razionale degli antibiotici nel trattamento delle piodermiti nel cane e nel gatto. *Veterinaria* 3, 11-22.
- Guardabassi, L., Jensen, L. B., Kruse, H. (2008). *Guide to antimicrobial use in animals*. Blackwell Publishing, 9-10,19-20, 45-47, 183-206.
- Guardabassi, L., Schwarz, S., Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 321-332.
- Götz, F., Bannermann, T., Schleifer, K. H. (1981). The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, pag. 5-75, In *The Prokaryotes*. Ed. Springer, (2006).
- Hanaki, H., Kuwahara-Arai, K., Boyle-Vavra, S., et al. (1998). Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 199-209.
- Hanssen, A. M., Ericson Sollid, J. U. (2005). SCCmec in staphylococci: genes on the move. *Federation of European Microbiological Societies* 46, 8-20.
- Hartmann, F. A., White, D. G., West, S. E. H., et al., (2005). Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. *Veterinary Microbiology* 108, 119-131.
- Hesselbarth, J., Schwarz, S. (1995): Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Veterinary Microbiology* 45, 11-17.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., et al. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet* 350, 1670-1673.

8. BIBLIOGRAFIA

- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., et al. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40, 135-136.
- Hoekstra, K. A., Paulton, R. J. L. (2002). Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dogs. *Journal of Applied Microbiology* 93, 406-413.
- Hooper, D. C. (2000). Mechanism of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Infectious Diseases Society of America* 31, 24-28.
- Hooper, D. C. (2002). Fluorquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infectious Diseases Journal* 2, 530-538.
- Igimi, S., Takahashi, E., Mitsuoka, T. (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 409-411.
- Intorre, L., Vanni, M., Di Bello, D., Pretti, C., et al. (2007). Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30, 464-469.
- IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana). (2003). First report ITAVARM (Italian Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring), pag. 34-35
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanism of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 41, 120-126.
- Jevons, M. (1961). Celbenin resistant staphylococci. *British Medical Journal* I, 124-125.
- Jousson, O., Di Bello, D., Vanni, M., et al. (2006). Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal species of canine origin with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. *Veterinary Microbiology* 123, 238-244.

8. BIBLIOGRAFIA

- Kaatz, G. W., Seo, S. M. (1997). Mechanism of fluorquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2733-2737.
- Kaatz, G. W., Seo, S. M., Ruble, C. A. (1993). Efflux-mediated fluorquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37, 1086-1094.
- Kadlec, K., Schwarz, S., Perreten, V., et al. (2010). Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1826-1837.
- Katzung B. G. (1989). *Farmacologia generale e clinica*. Ed. Piccin – Nuova Libreria, Padova, 2007.
- Kempker, R., Mangalat, D., Kongphet-Tran, T., Eaton, M. (2009). Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. *American Journal of Medical Sciences* 338, 425-427.
- Keseru, J. S., Szabo, I., Gal, Z. et al. (2011). Identification of β -lactamases in human and bovine isolates of *Staphylococcus aureus* strains having borderline resistance to penicillinase-resistant penicillins (PRPs) with proteomic methods. *Veterinary Microbiology* 147, 96-102.
- Khorvash, F., Mostafavizadeh, K., Mobasherizadeh, S. (2008). Frequency of *mecA* gene and borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial acquired methicillin resistance *Staphylococcus aureus* infections. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (9), 1282-1285.
- Kloos, W. E., Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan., vol. 7, No. 1, 117-140.
- Kloos, W. E., Schleifer, K. H. (1975). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 1, 82-88.
- Kuroda, M., Kuwahara-Arai, K., Hiramatsu, K. (2000). Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by

8. BIBLIOGRAFIA

cDNA differential hybridization method. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 485-490.

- La Placa, M. (1971). Stafilococchi, pag. 208-216; I farmaci antibatterici, pag. 178, in *Principi di microbiologia medica*. Società editrice Esculapio s.r.l., Bologna, 2008.
- Lambert, L. H., Cox, T., Mitchell, K., et al. (1998). *Staphylococcus succinus* sp. Nov., isolated from Dominican amber. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 511-518.
- Loeffler, A., Boag, A. K., Sung J. (2005). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 692-697.
- Malik, S., Peng, H., Barton M. D. (2005). Partial nucleotide sequencing of the *mecA* genes of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 2006, 413-416.
- Manian, F. A. (2003). Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pet dog associated with MRSA infections in household contact. *Clinical Infectious Diseases* 36, 26-28.
- Martino, P. A., Caldora, C., Cocilovo, A., Dall'Ara, P. (1996). Classificazione dei batteri e batteriologia speciale in Poli, G., Cocilovo, A., Dall'Ara, P., Martino, P. A., Ponti, W., *Microbiologia e Immunologia veterinaria*. Seconda edizione UTET-Torino, pag. 199-266, 2005.
- Massidda, O., Montanari, M. P., Mingoia, M., Varaldo, P. E. (1996). Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (n°12), 2769-2774.

8. BIBLIOGRAFIA

- Matsuo, M., Hishinuma, T., Katayama, Y., et al. (2011). Mutation of RNA polymerase β subunit (rpoB) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4188-4195.
- Mazza, P., Dacarro, C. (1998). Antibiotici e chemioterapici antimicrobici, pag. 306, in *Microbiologia farmaceutica*. Società Editoriale Farmaceutica, Milano.
- McDougal, L. K., Thornsberry, C. (1986). The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *Journal of Clinical Microbiology* 23 (n°5), 832-839.
- Meucci, V., Vanni, M., Guardabassi, L., et al. (2010). Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Veterinary Research Communications* 34, 79-83.
- Moodley, A., Stegger, M., Bagcigil, A. F. et al. (2006). PFGE and spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 1118-1123.
- Moreira, B., Boyle-Vavra, S., DeJonge, B. L. M., Daum, R. S. (1997). Increased production of Penicillin-Binding Protein 2, increased detection of other Penicillin-Binding Proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 1788-1793.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., et al. (2002). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 245-250.
- Neoh, H., Cui, L., Yuzawa, H., et al. (2008). Mutated response regulator graR is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-

8. BIBLIOGRAFIA

intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 45-53.

- Neyfakh, A. A. (1992). The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 484-485.
- Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P. et al. (2011). Vancomycin-resistance transferability from *vanA* enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 62, 1363-1367.
- Noble, W. C., Virani, Z., Cree, R. G. A. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 93, 195-198.
- O'Mahony, R., Abbott, Y., Leonard, F. C. et al. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Veterinary Microbiology* 109, 285-296.
- Pan, A., Battisti, A., Zoncada, A., et al. (2009). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerging Infectious Diseases* 15, 845-846.
- Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., et al. (2011). Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology* 147, 142-148.
- Paul, N. C., Moodley, A., Ghibaudo, G., Guardabassi, L. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses and Public Health* 58, 533-539.
- Peacock, S. J., Lina, G., Etienne, J., Foster, T. J. (1999). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* expresses a fibronectin-binding protein. *Infection and Immunity* 67, 4272-4275.

8. BIBLIOGRAFIA

- Perichon, B., Courvalin, P. (2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 4580-4587.
- Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., et al. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicenter study. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 65, 1145-1154.
- Poli, G., Cocilovo, A., Dall'Ara, P., et al. (1996). *Microbiologia e immunologia veterinaria*, UTET – Scienze Mediche, Torino, Seconda edizione, 2005.
- Prescott, J. F., Brad Hanna, W. J., Reid-Smith, R., et al. (2002). Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *The Canadian Veterinary Journal* 43, 107-116.
- Radaelli, S. V. Proteina A e meticillino-resistenza in stafilococchi isolati dal cane: indagine preliminare. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria, a.a. 1999-2000. Relatore: Prof. Poli G., correlatore: Dr. Martino P. A.
- Rice, L. B. (2000). Bacterial Monoplists: The Bundling and Dissemination of Antimicrobial Resistance Genes in Gram-Positive Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 31, 762-9.
- Ruegg, P. L. (2009). The quest for the perfect test: phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 134, 15-19.
- Ruffo, G. *Staphylococcus* in Farina, R., Scatozza, F. *Malattie infettive degli animali domestici*. 2° edizione UTET-Torino (1998), pag. 243-254
- Sabath, L. D. (1986). Some historical aspects of bacterial resistance in *Symposium on Bacterial Resistance: Exploring the Facts And Myths*, New York Academy of Medicine, March 1986.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., et al. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2770-2778.

8. BIBLIOGRAFIA

- Sayers, A. A., Whitt, D. D. (2002). *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*, seconda edizione, Ed ASM Press, Washington, D. C.
- Schilling, A., Neuner, E., Rehm, S. J. (2011). Vancomycin: a 50-something-year-old antibiotic we still don't understand. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 78, 465-471.
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32, 201-225.
- Shittu, A., Lin, J., Morrison, D., Kolawole, D. (2006). Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. *Journal of Medical Microbiology* 55, 317-324.
- Smith, T. C., Pearson, N. (2011). The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 11, 327-339.
- Soedarmanto, I., Kanbar, T., Ulbeqi-Mohyla, H., et al. (2011). Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. *Research in Veterinary Science* 91, 25-27.
- Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C. A., Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 2047-2048.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., Witte, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4089-4094.
- Tabaqchali, S. (1997). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: apocalypse now? *The Lancet* 350.

8. BIBLIOGRAFIA

- Takahashi, H., Kikuchi, T., Shoji, S., et al. (1998). Characterization of *gyrA*, *gyrB*, *grlA* e *grlB* mutations in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 41, 49-57.
- Tenover, F. C., McDonald, L. C. (2005). Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18, 300-305.
- Tenover, F. C., Moellering, R. C. jr. (2007). The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease* 44, 1208-1215.
- Tenover, F. C., Weigel, L. M., Appelbaum P. C., et al. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 275-280.
- Thomas, J. R., Denap, J. C., Wong, M. L., Hergenrother, P. J. (2005). The relationship between aminoglycosides' RNA binding proclivity and their antiplasmid effect on an *IncB* plasmid. *Biochemistry* 44, 6800-6808.
- Ubukata, K., Itoh-Yamashita, N., Konno, M. (1989). Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1535-1539.
- van Duijkeren, E., Wolfhagen, M. J. H. M., Heck, M. E. O. C. et al. (2005). Transmission of Panton-Valentine leucocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12), 6209-6211.
- Van Hoovel, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., et al. (2006). First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4609-4612.

8. BIBLIOGRAFIA

- Varaldo, P. E., Klipper-Balz, R., Biavasco, F., et al. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. Nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 436-439.
- Waller A. (2005). The creation of a new monster: MRSA and MRSI – Important emerging veterinary and zoonotic diseases. *The Veterinary Journal* 169, 315-316.
- Wedley, A. L., Maddox, T. W., Nuttall, T. J., et al. (2010). The prevalence of antimicrobial resistance in coagulase positive staphylococci isolated from nasal samples from dogs in Great Britain. *Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment*, American Society for Microbiology, pag. 63.
- Weese, J. S. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. *Journal of the American Animal Hospital Association* 41, 150-157.
- Weese, J. S., Dick, H., Willey, B. M. et al. (2006). Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology* 115, 148-155.
- Weese, J. S., Rousseau, J., Traub-Darfat, J. L. et al. (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *Journal of Veterinary Medicine Association* 226, 580-583.
- Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R. et al. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302, 1569-1571.
- WHO (World Health Organization). (2004). WHO Workshop on the Containment of Antimicrobial Resistance in Europe. Report on a WHO Meeting 2004, Germany, pag. 9-12.
- Wielders, C. L. C., Vriens, M. R., Brisse, S., et al. (2001). Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 357, 1674-1675.

8. BIBLIOGRAFIA

- Wisplinghoff, H., Rosato, A. E., Enright, M. C., Noto, M., Craig, W., Archer, G. L. (2003). Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3574-3579.
- Woolley, K. L., Kelly, R. F., Fazakerley, J., et al. (2007). Reduced in vitro adherence of *Staphylococcus* species to feline corneocytes compared to canine and human corneocytes. The Authors. *Journal compilation* 19, 1-6.
- Yamashita, K., Shimizu, A., Kawano, J., et al. (2005). Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus aureus* subsp. *coagulans* isolates. *Journal of Veterinary Medical Science* 67, 263-268.
- Yoneyama, H., Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 1060-1075.
- Yoo, J., Yoon, J. W., Lee, S., Park, H. (2010). High prevalence of fluorquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma and otitis externa in veterinary teaching hospital. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 798-802.
- Zdovc, I., Ocepek, M., Pirs, T., et al. (2004). Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. *Journal of Veterinary Medicine series B – Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 51, 449-454.
- Zhu, W., Murray, P. R., Huskins, W. C., et al. (2010). Dissemination of an Enterococcus Inc18-like vanA plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4314-4320.