

INDICE	1
PREMESSA	3
1. INTRODUZIONE	4
2. STAFILOCOCCO AUREUS	5
2.1 FATTORI DI VIRULENZA	6
2.1.1 Componenti strutturali	6
2.1.2 Esotossine	7
2.1.2.1 Citotossine	7
2.1.2.2 Tossine esfoliative	10
2.1.2.3 Enterotossine	10
2.1.2.4 Tossina-1 della sindrome da shock tossico	11
2.2.1 Esoenzimi	11
3. ANTIBIOTICI UTILIZZATI NELLE INFEZIONI DA STAFILOCOCCO AUREUS	16
3.1 β-lattamici	16
3.2 Glicopeptidi	20
4. ANTIBIOTICO RESISTENZE	21
4.1 Resistenza ai β-lattamici	21
4.2 Resistenza ai Glicopeptidi	33
5. SCOPO DEL LAVORO	34
6. MATERIALI E METODI	35
6.1 Terreni di coltura	35
6.2 Raccolta dei campioni e valutazione della sensibilità dei ceppi isolati alla Ceftarolina	35
6.3 Estrazione del DNA dei ceppi CPT-non suscettibili	37
6.4 Amplificazione campioni mediante PCR	38
6.5 Determinazione delle mutazioni a livello del gene <i>mecA</i>, <i>PBPs</i> e <i>gdpP</i>	40
6.6 Determinazione dei Sequence Type	40
6.7 Spa Typing	41
6.8 Caratterizzazione dei ceppi MRSA	42
7. RISULTATI	45
7.1 Mutazioni puntiformi a livello della PBP2a	48
7.2 Mutazioni puntiformi a livello delle PBPs	48
7.3 Mutazioni puntiformi a livello della GdpP	48

7.4 Epidemiologia degli MRSA CPT-non suscettibili	49
8. DISCUSSIONE	52
9. CONCLUSIONE	55
BIBLIOGRAFIA	56

PREMESSA

Le malattie infettive hanno rappresentato e rappresentano oggi una importante causa di mortalità. L'introduzione in terapia di agenti antimicrobici ha rivoluzionato la medicina riducendo i tassi di morbilità e di mortalità causati da patologie batteriche. Poco tempo dopo l'introduzione delle terapie antibiotiche si è osservato lo sviluppo di ceppi batterici resistenti. I batteri sono organismi molto semplici, riescono a moltiplicarsi in poco tempo e dimostrano una grande capacità di reagire alle terapie e quindi di sviluppare resistenza.

Ogni volta che un batterio sviluppa una resistenza si va a modificare la terapia antibiotica fino ad avere infezioni sempre più gravi con assenza di scelte terapeutiche.

L'antibiotico resistenza è quindi un fenomeno complesso e rappresenta un problema di Sanità Pubblica, può essere determinata da molteplici fattori come l'utilizzo non corretto di antibiotici, l'interruzione precoce del trattamento con possibilità per i batteri di perfezionare i meccanismi di resistenza alla molecola alla quale sono esposti.

Lo *Staphylococcus aureus* è uno degli agenti batterici in grado di causare infezioni gravi e letali nell'uomo. Con la scoperta della Penicillina è stato possibile trattare questo batterio, ma successivamente si è assistito allo sviluppo di meccanismi di resistenza che gli hanno consentito di sopravvivere alle terapie con i beta-lattamici come la Meticillina, con la comparsa dello *Staphylococcus aureus* Meticillino-resistente (MRSA), la successiva diffusione sia in ambito nosocomiale (HA-MRSA) e in ambito comunitario (CA-MRSA).

Lo scopo della tesi è stato quello di testare questi ceppi MRSA nei confronti di una nuova Cefalosporina di quinta generazione, la Ceftarolina, di individuare i ceppi resistenti-intermedi e di identificarne i meccanismi di resistenza.

1. INTRODUZIONE

Stafilococchi

Gli Stafilococchi sono dei microrganismi procarioti Gram-positivi. Il genere comprende 49 specie e 27 sottospecie, molte delle quali sono associate alla cute e alle mucose dell'uomo.

Hanno un diametro di circa 1µm e sono disposti in ammassi irregolari o a grappoli ed hanno forma a "cocco".^{1,2}

Sono capaci di replicare e determinare malattia sia in condizioni di aerobiosi che di anaerobiosi, in presenza di una elevata concentrazione di sale (sono alotolleranti), a temperature comprese tra 18°C e 40°C e non hanno grandi esigenze dal punto di vista nutrizionale. Sono Catalasi positivi, cioè producono un enzima che converte il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno.

Gli Stafilococchi vengono divisi in due grandi gruppi sulla base dell'enzima coagulasi:

COAGULASI-POSITIVI	COAGULASI-NEGATIVI	
<i>S. aureus</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. muscae</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. nepalensis</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>S. lutrae</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. pulvereri</i>
	<i>S. condimenti</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
	<i>S. equorum</i>	<i>S. schleiferi</i>
	<i>S. felis</i>	<i>S. sciuri</i>
	<i>S. fleurettii</i>	<i>S. simiae</i>
	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. simulans</i>
	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. succinus</i>
	<i>S. hominis</i>	<i>S. vitulinus</i>
	<i>S. kloosii</i>	<i>S. warneri</i>
	<i>S. lentus</i>	<i>S. xylosus</i>

(in grassetto le specie umane)

2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

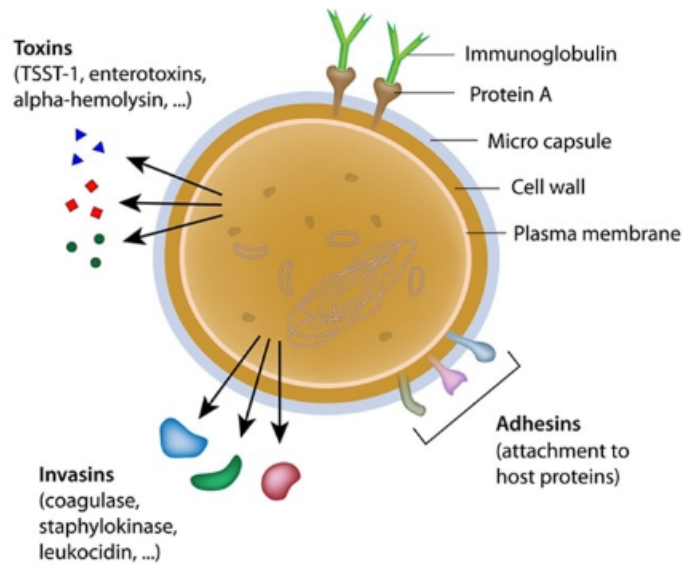


Fig. 1 Struttura dello *Staphylococcus aureus*. A.Medical Media

Lo Stafilococco aureo (*Staphylococcus aureus* Fig.1) è un commensale dell'uomo, è presente nella flora microbica normale di numerose parti del corpo, ma può essere responsabile di infezioni ospedaliere e acquisite in comunità.

Infetta il sistema sanguigno, la cute, le alte e le basse vie respiratorie³, ma è responsabile anche di infezioni molto gravi come osteomieliti e endocarditi⁴.

In coltura su piastra Petri, lo *S. aureus* forma delle colonie di colore giallo per la presenza di pigmenti carotenoidi che il batterio sintetizza durante la crescita e da questo colore deriva il nome della specie.

Come terreno per la sua crescita ed identificazione viene utilizzato il Chapman, composto da cloruro di sodio al 7,5% (per l'inibizione della crescita di altri batteri) e mannitolo (zucchero fermentato solo da *S. aureus* e non dagli altri Stafilococchi). Durante la crescita lo *S. aureus* è in grado di far virare il pH del terreno che da rosa assume una colorazione gialla.

Sono in grado di produrre una pellicola idrosolubile, il biofilm, costituita da monosaccaridi, proteine e piccoli peptidi che consente il legame dei batteri agli organi da trapianto, valvole artificiali, protesi.

2.1 FATTORI DI VIRULENZA

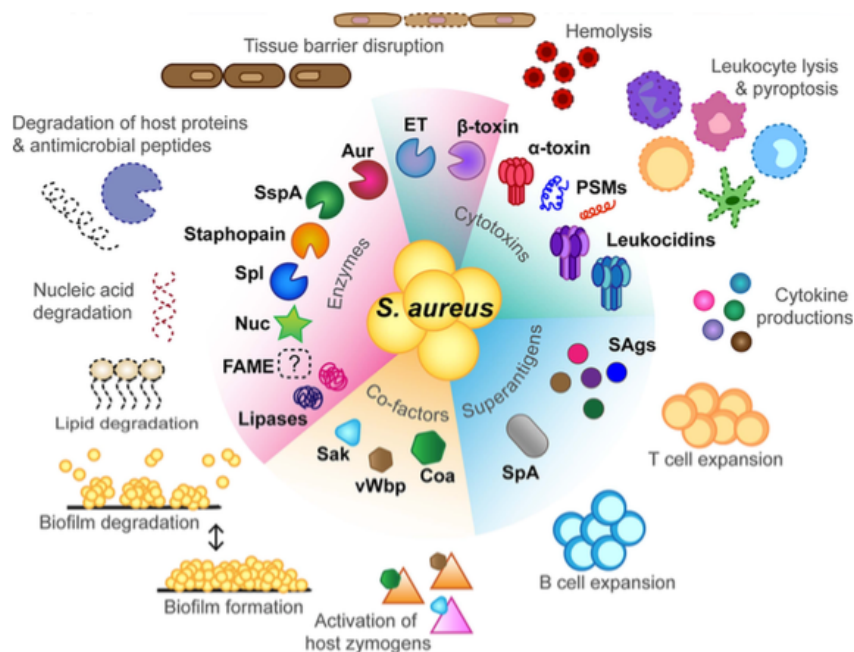


Fig.2 Meccanismi di patogenicità dello *Staphylococcus aureus*. Tam K. e Torres V.J

2.1.1 Componenti strutturali

La parete dei batteri Gram-positivi è una struttura complessa costituita da glicoproteine. (Fig.2) 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-glucosammina) 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 di pentaglicina 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.⁵ Questi sono polimeri specie specifici costituiti da fosfato che si legano covalentemente ai residui di acidi N-acetilmuramico del peptidoglicano o ai lipidi della membrana citoplasmatica (acidi lipoteicoici). Gli acidi teicoici quando sono legati al peptidoglicano sono in grado di stimolare una specifica risposta immunitaria.

Gli enzimi che catalizzano la costruzione dello strato di peptidoglicano sono chiamate "Penicillin-Binding-Protein" (PBP), ovvero proteine leganti la Penicillina.

Lo *S. aureus* esprime sulla propria parete delle proteine di adesione superficiale che vanno a costituire i fattori di virulenza perché legandosi alle proteine della matrice cellulare, sono in grado di aderire ai tessuti dell'ospite. La maggior parte di queste proteine sono legate al peptidoglicano della parete degli stafilococchi e sono chiamate proteine MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules).⁶

La membrana citoplasmatica è invece formata da un insieme di proteine, lipidi e in piccola quantità anche di carboidrati e funge da barriera osmotica per la cellula e da ancoraggio per gli enzimi cellulari della biosintesi e della respirazione.

Lo strato più esterno della parete cellulare invece è costituito da una capsula polisaccaridica che protegge il batterio inibendone la fagocitosi.

2.1.2 Esotossine

Le esotossine sono delle sostanze solubili prodotte e liberate dallo *S. aureus* nell'ambiente extracellulare e comprendono le citotossine (alfa, beta, gamma, delta e leucocidine), le enterotossine, le tossine esfoliative e la tossina dello shock tossico.⁷

2.1.2.1 Citotossine

Le citotossine sono molecole secrete da *S. aureus*, che hanno azione distruttiva sulla membrana perché causano la formazione di pori di membrana. I pori che si formano determinando un efflusso di molecole e metaboliti vitali, con un conseguente squilibrio nutrizionale e osmotico che impedisce al batterio di sopravvivere. Queste tossine sono definite citolitiche.

Si distinguono in due sottogruppi⁸:

1. **Recettore-mediato**: in questo tipo di tossine la lisi è determinata dall'interazione iniziale tra tossina e recettore. Queste tossine colpiscono specifiche cellule bersaglio che presentano il recettore riconosciuto dalla tossina.

Lo *S. aureus* quindi produce diverse citotossine, la maggior parte di esse lisano i globuli rossi (emolisine) e/o bianchi (leucotossine).

L'**alfa-tossina**⁹ (nota anche come α -emolisina o Hla) è codificata dal gene *hla* che si trova in un operone monocistronico nel genoma di *S. aureus*. È probabilmente la tossina più nota di *S. aureus* e il primo esempio di tossina con struttura di β -barrel, cioè costituita prevalentemente da foglietti beta. È in grado di lisare i globuli rossi e una serie di leucociti, ma non neutrofili. È lunga 293 aminoacidi e genera un poro a forma di eptamero di 1-2 nm che consente un efflusso di K^+ e afflusso

di Na⁻ e Ca⁺ e di altre piccole molecole provocando un rigonfiamento osmotico e la lisi cellulare. L'eptamero della tossina alfa ha tre domini principali: un dominio del cappuccio extracellulare, un dominio dello stelo che forma il poro del β -barrel e un dominio del bordo che conferisce la specificità del recettore. Una mutazione a livello dell'His-35 interrompe la formazione del poro e l'inattivazione della tossina.

A concentrazioni elevate, la formazione dei pori può essere indipendente dal recettore, ma recentemente la formazione dei pori a concentrazioni inferiori ha dimostrato di dipendere dall'interazione con il recettore ADAM10.¹⁰ Il legame di alfa-tossina con ADAM10, una disintegrina e metalloproteinasi, porta alla rottura definitiva delle adesioni cellulari. In particolare, la scissione della E-caderina nelle cellule epiteliali porta alla perdita della funzione di barriera epiteliale. È considerata un mediatore del danno tissutale nella patologia stafilococcica, provoca anche apoptosi nei monociti umani, nei linfociti T e B.

Lo *S. aureus* produce anche una serie di **tossine bicomponenti (PFTs)**¹¹ che sono strutturalmente simili alla tossina alfa e appartengono alla famiglia delle tossine beta-barrel che formano i pori.

La **Leucocidina Panton-Valentine (PVL)** è una delle più note ed è costituita da due proteine LukS e LukF. La PLV è stata associata a infezioni da ceppi di *S. aureus* resistenti alla Meticillina comunitari (CA-MRSA). Inizialmente si riteneva che funzionasse in modo indipendente dal recettore, la scoperta del recettore di LukDE (CCR5) e le successive scoperte dei recettori di PVL (C5aR1 and C5aR2) e LukAB (CD11b) hanno mostrato chiaramente che queste tossine richiedono l'interazione dei recettori per l'attività citolitica.

Il locus genico *pvl* è codificato all'interno dei genomi di almeno sei profagi^{12,13}. Oltre il 90% dei ceppi associati a polmonite necrotizzante grave e infezioni acquisite in comunità hanno il locus *pvl*.

PVL mostra specificità di specie, legando e distruggendo solo i leucociti umani e di coniglio. uccidendo solo il coniglio e i leucociti umani. La specificità della specie è dovuta al fatto che ha come bersaglio i recettori accoppiati a proteine G umane e di coniglio, C5aR1 e C5aR2.^{14,15}

Oltre alla PVL possono essere prodotte anche altre leucocidine.

La **LukED**: il locus lukED è nel cluster del gene *vSa β* . Questo locus comprende due geni, *lukE* e *lukD*.¹⁶

I primi studi su LukED hanno dimostrato l'attività litica della tossina nel coniglio, negli eritrociti e nei neutrofili umani. Ha affinità per i recettori accoppiati alle proteine G (CXCR1, CXCR2, CCR5 e DARC) su neutrofili, monociti, macrofagi, cellule dendritiche, cellule NK, cellule T e globuli rossi,

La **LukAB**: il locus genico LukAB si trova nel core del genoma di *S. aureus*. La regione C-terminale di LukA è fondamentale per l'attività delle tossine, poiché la sua delezione o mutazione all'interno di

questa regione (cioè la mutazione E323A) rende inattiva la tossina.¹⁷ A differenza delle altre leucocidine, che sono secrete come monomeri, LukAB è secreto come eterodimero.

Ha affinità per il recettore CD11b presente sui leucociti, inclusi neutrofili, monociti, macrofagi, cellule dendritiche e cellule NK.¹⁸

La **gamma emolisina** si trova in un locus genico nel core del genoma di *S. aureus*.^{19,20}

Il locus comprende tre geni: il gene *hlgA*, con il suo promotore, seguito da un operone contenente *hlgC* e *hlgB*, trascritto da un diverso promotore.²¹ HlgA e HlgC sono composte da due catene polipeptidiche che includono la componente S (proteina a lenta eluizione) e la componente F (proteina a rapida eluizione). HlgB forma due leucocidine: HlgAB e HlgCB, ognuna con le sue proprietà.

HlgAB si lega ai recettori umani CXCR1, CXCR2, CCR2 e DARC (il recettore dell'antigene di Duffy per le chemiochine), lisa gli eritrociti umani, neutrofili, monociti e macrofagi.²²

HlgCB è una tossina specifica per l'uomo che colpisce le cellule che esprimono i recettori C5aR1 e C5aR2 (gli stessi recettori mirati dal PVL).²³

2. Recettore non-mediato: tossine che interferiscono con le membrane in modo meno specifico perché non hanno affinità nei confronti di un recettore.

La **delta-tossina** di *S. aureus* (delta-emolisina) è un membro di una famiglia di peptidi chiamati phenol-soluble modulins (PSM), i quali hanno molteplici funzioni nella patogenesi stafilococcica.²⁴

Lo *S. aureus* produce elevate quantità di PSM fortemente citolitici, in particolare i peptidi PSM α (PSM α 1 – α 4) codificati nel locus genico *psm α* (PSM α 3 è il più attivo). Le PSM innescano risposte infiammatorie mediante l'interazione con il recettore FPR2, ma la loro attività citolitica è indipendente dalla FPR2.²⁵ Sono piccoli peptidi anfipatici con proprietà detergenti.

I peptidi PSM α di *S. aureus* sono stati identificati come le tossine che contribuiscono alla lisi dei neutrofili dopo la fagocitosi. Ha uno spettro ampio di attività citolitica per gli eritrociti, per le cellule di mammifero e strutture membranose intracellulari.

La **tossina beta**, viene anche chiamata sfingomielinasi C, è una proteina labile al calore ed è prodotta dalla maggior parte dei ceppi di *S. aureus*, è in grado di degradare la sfingomielina presente sulla superficie delle cellule ospiti catalizzando l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana nelle cellule sensibili. È tossica per una grande varietà di cellule, come eritrociti, fibroblasti, leucociti e macrofagi.

In molti ceppi virulenti di *S. aureus*, il gene che codifica per la beta-tossina (*h/b*) è interrotto da un'isola di patogenicità.²⁶ La beta-tossina non è quindi considerata un fattore di virulenza importante.

2.1.2.2 Tossine esfoliative

Questo tipo di tossine provocano la sindrome stafilococcica della cute scottata (SSSS), caratterizzata da dermatite esfoliativa.

Sono state identificate due forme diverse di tossina esfoliativa:

- ✚ ETA è termostabile e il gene che la codifica è localizzato in un fago
- ✚ ETB è termolabile e il gene che lo codifica è localizzato in un plasmide.

Queste tossine sono delle serin-proteasi che rompono la desmogleina-1 (proteina per l'adesione intercellulare) nello strato granuloso dell'epidermide.

Le tossine non sono associate a citolisi o a infiammazione, per cui nello strato dell'epidermide coinvolto dall'infezione non si trovano né stafilococchi né leucociti. Dopo l'esposizione dell'epidermide alla tossina, si sviluppano anticorpi neutralizzanti protettivi che portano alla risoluzione del processo tossico. L'SSSS è osservabile principalmente in bambini piccoli e solo raramente negli adolescenti e negli adulti.

2.1.2.3 Enterotossine

Sono state inoltre identificate numerose enterotossine stafilococciche specifiche (A-X) tra le quali l'enterotossina A che è più comunemente associata alle intossicazioni alimentari. Le enterotossine C e D si ritrovano in prodotti caseari contaminati e l'enterotossina B provoca enterocolite pseudomembranosa stafilococcica.

Sono in grado di causare malattie alimentari, sono resistenti all'idrolisi da parte degli enzimi gastrici e del digiuno e sono stabili al riscaldamento a 100°C per 30 min. Queste tossine vengono definite "superantigeni", capaci di indurre l'attivazione non specifica dei linfociti T e il rilascio di grandi quantità di citochine, interferiscono con la funzione intestinale causando vomito e diarrea. Le enterotossine hanno una struttura costituita da una piega a due domini, una lunga elica centrale alfa, l'N-terminale con struttura a barile e un C-terminale.

I meccanismi con cui funzionano le enterotossine stafilococciche non sono ben noti, ma possono includere l'attivazione del rilascio di citochine, causando infine la morte cellulare per apoptosi.

2.1.2.4 Tossina-1 della sindrome da shock tossico (TSST-1)

La TSST-1 è una esotossina termoresistente, proteolisi-resistente codificata da un gene cromosomico. È il superantigene più conosciuto e provoca la sindrome da shock tossico (TSS) stimolando il rilascio di IL-1, IL-2, TNF- α e altre citochine.

La TSS è una malattia grave e potenzialmente fatale. È in grado di determinare la perdita di cellule endoteliali a basse concentrazioni e un effetto citotossico ad alte concentrazioni.

2.2.1 Esoenzimi

Gli esoenzimi vengono distinti in:

- a) **Cofattori per l'attivazione di enzimi della cellula ospite:** sono cofattori prodotti da *S. aureus*, ma non hanno loro stessi una attività enzimatica, ma attivano gli enzimi della cellula ospite.

Stafilochinasi (Sak) è in grado di attivare il plasminogeno dalla plasmina, andando a degradare i coaguli di fibrina. Il significato biologico di questa attività è quello di andare a diminuire la funzione del reticolo di fibrina che mantiene localizzata l'infezione da Stafilococco. Inoltre è in grado di tagliare il fattore del complemento C3b²⁷ insieme ad altre proteasi quali la proteina legante il fibrinogeno (Efb) e l'inibitore del complemento (SCIN).^{28,29}

La Sak è una proteina a singolo dominio che consiste in una α elica centrale, un foglietto β a cinque strand e due strand β più corti.³⁰ È in grado di formare un complesso con la plasmina nel siero (Sak-plasmina) ed è altamente efficiente nel convertire il plasminogeno in plasmina. Quando il complesso Sak-plasmina è attivo, i primi 10 residui nell'N-terminale del Sak maturo vengono rimossi per esporre il residuo Lys11.³¹ L'eliminazione di Lys11 disattiva Sak.³²

Il complesso Sak-plasmina è sensibile all'attività di dissociazione dell' α 2-antiplasmina, ma i complessi legati alla fibrina sono protetti dall'inattivazione.³³ Questi ultimi scindono le IgG e la C3b umana, prevenendo in tal modo l'opsonizzazione dei batteri da parte del sistema del complemento.³⁴

È importante sottolineare che Sak neutralizza le attività battericide di α -defensine e LL-37 che sono due principali peptidi antimicrobici umani.^{35,36}

La Sak inoltre riduce la formazione di biofilm e facilita il distacco del biofilm maturo attivando il plasminogeno.³⁷

È per questo che i ceppi ad alta produzione di Sak sono spesso associati alla riduzione della formazione di biofilm in vitro e infezioni non invasive nell'uomo.³⁸

Coagulasi

Lo *S. aureus* possiede due tipi di coagulasi: una libera (Clumping factor) e l'altra legata. La coagulasi legata alla parete degli stafilococchi può convertire direttamente il fibrinogeno in fibrina insolubile e provocare la formazione di un coagulo nel quasi si annidano gli stafilococchi.

La coagulasi libera porta allo stesso risultato perché reagisce con un fattore delle globuline plasmatiche per formare la stafilotrombina, un fattore trombina-simile, che a sua volta catalizza la conversione di fibrinogeno in fibrina insolubile.

La coagulasi può causare la formazione di uno strato di fibrina intorno ad un ascesso stafilococcico, localizzando l'infezione e proteggendo il microrganismo dalla fagocitosi.

Produce l'enzima coagulasi che viene sfruttato nello screening diagnostico: quando una colonia di *S. aureus* è sospesa nel plasma, la coagulasi lega un fattore presente nel siero e questo complesso converte il fibrinogeno in fibrina, provocando la formazione di un coagulo, viene quindi definito coagulasi-positivo, per distinguerlo dai negativi che sono meno virulenti e causano principalmente infezioni opportunistiche.

b) Enzimi che degradano i tessuti dell'ospite

Nucleasi

La nucleasi stafilococcica richiede ioni Ca^{2+} per l'attività, è conosciuta anche come termonucleasi per la sua resistenza all'inattivazione al calore. Funziona sia come una eso che endo-nucleasi e va a degradare i substrati di DNA e RNA attraverso la scissione del legame estere 5'-fosforilico.^{39,40}

I geni che codificano per la nucleasi presenti nel genoma di *S. aureus* sono *nuc* e *nuc2*, e si trovano in regioni diverse del cromosoma e sono sotto il controllo di promotori separati. Nuc è presente sottoforma di due isoforme: NucB e NucA.^{41,42}

Il secondo ruolo di Nuc è mediare la fuga batterica dai NET che è un meccanismo innato di difesa immunitaria mediante il quale il DNA viene rilasciato dai neutrofili dopo degradazione.

Proteasi (metalloproteasi, serine proteasi, cisteine proteasi, ialuronidasi, lipasi)

Gli stafilococchi codificano tre famiglie di proteasi secrete: metalloproteasi, cisteina-proteasi e serina-proteasi. Queste proteasi sono implicate nell'acquisizione di nutrienti, nella diffusione batterica e nell'evasione immunitaria. È stato osservato che *S. aureus* produce 12 proteasi: una metalloproteasi (aureolysin [Aur]), due proteasi cisteina (staphopain A [ScpA] e staphopain B [SspB]) e nove serina-proteasi.

Aureolysin (Aur): è una metalloproteasi nota anche come proteasi III, è costituita da due domini conservati comuni alle metalloproteasi batteriche della famiglia delle termolisine: il dominio all'N-terminale (β -foglietto) e il dominio al C-terminale (α -elica).⁴³

Aur si autoattiva mediante autoproteolisi attraverso la scissione del pro-peptide N-terminale. L'enzima attivo scinde i legami peptidici dei residui idrofobici all'N-terminale come alanina, isoleucina e tirosina.⁴⁴ La presenza di Zn^{2+} è necessaria per l'attività enzimatica, ma CO^{2+} può agire come sostituto e aumentare l'attività enzimatica.⁴⁵ Inoltre, il legame con gli ioni Ca^{2+} stabilizza Aur, mentre gli agenti chelanti, come l'EDTA, denaturano irreversibilmente la proteina.⁴⁶

Contribuisce anche all'evasione del sistema immunitario attraverso la scissione e l'attivazione del peptide antimicrobico LL-37, promuovendo così la sopravvivenza di *S. aureus*;⁴⁷ può influenzare l'attivazione del complemento tagliando le proteine del complemento da C3 a C3a e C3b nel siero. C3a, è ulteriormente degradata da Aur, impedendo l'attivazione dei leucociti.⁴⁸

C3b solubile è inibito e degradato dal fattore H e dal fattore I nel siero. Il degrado di C3 da parte di Aur inibisce la formazione del complesso di attacco alla membrana sui batteri e favorisce la sopravvivenza dei batteri.

Serine proteasi (SspA):

La serina proteasi (SspA) è anche conosciuta come la proteasi V8 o GluV8. Il gene che codifica per SspA (*sspA*) fa parte dell'operone della serina-proteasi dello Stafilococco e consiste di tre geni: *sspA*, *sspB* e *sspC*.⁴⁹

L'SspA è una glutamil endopeptidasi e fa parte di un piccolo gruppo di proteasi seriniche che agiscono a livello dei siti del glutammato e dell'aspartato al C-terminale.⁵⁰

L'SspA contribuisce all'evasione dal sistema immunitario degradando le sue proteine e quelle dell'ospite. SspA cliva i fattori di legame del fibrinogeno sulla superficie cellulare di *S. aureus* e quindi riduce l'adesione batterica e migliora la diffusione batterica. L'SspA può anche degradare le proteine dell'ospite come l'inibitore dell' α 1-proteinasi,⁵¹ l'interleuchina e le immunoglobuline.^{52,53}

SspA può scindere LL-37, ma la scissione non inattiva il peptide antimicrobico.

L'SspA può distruggere le barriere epiteliali, compromettendo l'integrità della giunzione cellulare.

Cisteina-proteasi: Staphopains

Staphopain A (ScpA) è stata la prima cisteina-proteasi identificata in *S. aureus*. Successivamente la Staphopain B (SspB) e poi la Staphopain C sono state descritte in ceppi di *S. aureus* aviari.

ScpA e il suo inibitore intracellulare staphostatin A sono codificate dai geni *scpA* e *scpB* presenti nell'operone della cistein-proteasi stafilococcica.⁵⁴

Staphopain B (SspB) e il suo inibitore intracellulare staphostatin B (SspC) sono codificati dai geni *sspB* e *sspC* presenti nell'operone della cistein-proteasi stafilococcica.

ScpA scinde le elastine presenti nei tessuti connettivi, la proteina A del tensioattivo polmonare nei polmoni e il recettore delle chemochine CXCR2 sui leucociti.

SspB degrada il peptide antimicrobico LL-37, promuovendo così la sopravvivenza batterica, cliva anche CD11b e CD31, proteine di superficie che sono importanti per l'attivazione e la sopravvivenza dei fagociti.

Sia ScpA che SspB sono implicati nella formazione di biofilm.^{55,56}

Ialuronidasi

L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride lineare, codificato dal gene *hysA*, ed è costituito dalla ripetizione di N-acetilglucosamina e acido glucuronico collegate da legami glicosidici β -1,3 e β -1,4 alternati.⁵⁷ L'HA è un componente delle matrici extracellulari nei vertebrati, fornisce omeostasi e integrità strutturale a cellule e tessuti ed è anche importante per la regolazione immunitaria.^{58,59} Gli enzimi che scompongono l'HA sono noti come ialuronato-liasi o ialuronidasi.

Le ialuronidasi batteriche agiscono come endo-N-acetilesoaminidasi e scindono il legame β -1,4 in un processo noto come eliminazione- β , disgregando l'HA in disaccaridi insaturi.⁶⁰

S. aureus, insieme al *S. hyicus* sono gli unici stafilococchi noti per produrre ialuronidasi.^{61,62}

L'attività della ialuronidasi stafilococcica è stata descritta da Duran-Reynals nel 1933 come un "fattore di diffusione" che era in grado di aumentare la dimensione delle lesioni di una infezione nella cute di un coniglio preso come modello.⁶³ Successivamente, questo fattore di diffusione fu identificato da Chain e Duthie nel 1940 come ialuronidasi.⁶⁴

Fosfolipasi

S. aureus può produrre due fosfolipasi: la β -tossina e la fosfolipasi C specifica per fosfatidilinositolo (PI-PLC).

La β -tossina è una sfingomielinasi neutra con attività emolitica e citolitica raggruppata nelle citotossine. L'altra fosfolipasi stafilococcica, PI-PLC, idrolizza il fosfatidilinositolo (PI) in digliceride e inositolo fosfato.^{65,66} Oggi *S. aureus* rimane l'unico stafilococco noto per produrre PI-PLC.⁶⁷

La membrana di *S. aureus* non contiene PI, e quindi si ritiene che *S. aureus* abbia acquisito PI-PLC per adattarsi all'ospite.

Come altri PI-PLC batterici, il PI-PLC stafilococcico ha una struttura $(\beta\alpha)_8$ -barrel (chiamata TIM-barrel).⁶⁸ Il sito attivo di PI-PLC è conservato e si trova all'estremità C-terminale dei filamenti β che formano il β -barrel. PI-PLC è inattivato da NaCl, HgCl₂ e Cu₂SO₄.

Il PI-PLC batterico idrolizza il PI in due fasi: in primo luogo il PI viene idrolizzato in diacilglicerolo e il prodotto intermedio myo-inositolo 1,2-fosfato ciclico (cIP). Questo è seguito da una seconda idrolisi più lenta del cIP a formare il myo-inositolo 1-fosfato.^{69,70}

3. ANTIBIOTICI UTILIZZATI NELLE INFEZIONI DA STAFILOCOCCO AUREUS

3.1 β -lattamici

Il primo gruppo di antibiotici β -lattamici è rappresentato dalle **penicilline**, scoperte nel 1928 dallo scozzese Alexander Fleming. Le penicilline sono sostanze molecole antibatteriche prodotte dal metabolismo di alcune specie di *Penicillium*, in particolare *Penicillium notatum* e *Penicillium chrysogenum*.

Sono costituiti da un anello β -lattamico, ovvero un'amide ciclica con tre atomi di carbonio e uno di azoto e agiscono inibendo la sintesi del peptidoglicano della parete batterica.

Il nucleo centrale, l'anello β -lattamico-tiazolidinico ⁶, è rappresentato dall'acido 6-aminopenicillanico (a 5 atomi) che può essere considerato il risultato della fusione di due amminoacidi (L-cisteina e D-valina) in una struttura biciclica. L'ammina in posizione 6 può essere sostituita per ottenere i diversi composti antibiotici di questa classe.

I β -lattamici si legano ad un recettore di membrana con funzioni enzimatiche, ovvero le Penicillin Binding Proteins (PBP), che sono 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 β -lattamici per differenti PBP può spiegare il diverso spettro di azione, influenzato anche dall'eventuale presenza di β -lattamasi.

Le penicilline si legano al sito attivo delle PBP al posto dell'acil-D-alanil-D-alanina e vanno ad interferire con l'attività transpeptidasica, inibendo il cross-linkage tra le catene lineari di peptidoglicano. Si ha così 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 avviene per lisi provocata anche da lisine batteriche.

Il bersaglio dei β -lattamici è quindi la parete cellulare in via di formazione perché la sintesi di peptidoglicano è attiva solo durante la fase di crescita batterica, pertanto tali antibiotici agiscono esclusivamente su microrganismi in attiva replicazione e non esercitando alcun effetto su batteri in fase stazionaria.

Il secondo gruppo di antibiotici β -lattamici sono le **cefalosporine**⁷², derivate dall'acido 7-aminocefalosporanico formato da un anello diidrotiazinico legato ad un anello β -lattamico. L'anello diidrotiazinico è un anello a 6 atomi anziché a 5 atomi come le penicilline. Le prime cefalosporine

sono state isolate da una coltura di *Cephalosporium Acremonium*, ritrovate nelle fogne della Sardegna da un microbiologo, il prof. Brotzu.

La molecola scoperta da Brotzu venne chiamata Cefalosporina N ed è formata da una struttura centrale penicillinica ed una catena laterale costituita dall'acido 6-aminoadipico ed era attiva nei confronti dei batteri Gram-positivi ed alcuni Gram-negativi, Malgrado ciò non è stata utilizzata in clinica perché era poco efficace in vivo e aveva un discreto grado di tossicità.

Nel 1962 sono stati sintetizzati i primi antibiotici utilizzabili in terapia sostituendo alcuni residui legati all'acido 7-aminocefalosporanico. Negli anni successivi diverse molecole sono state sintetizzate utilizzando come struttura base l'acido cefalosporanico e modificando i residui ad esso collegati in modo da aumentare spettro di azione, efficacia e tollerabilità delle cefalosporine.

Si distinguono:

1. Cefalosporine di 1° generazione

Sono attive prevalentemente sui Cocchi Gram-positivi e meno attive sui Gram-negativi. Mostrano attività anche nei confronti di *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e nei confronti di Anaerobi del cavo orale. Fanno parte di questa generazione la Cefalotina, la Cefazolina, la Cefalexina e il Cefadroxil.

2. Cefalosporine di 2° generazione

Mostrano una maggiore attività verso i Gram-negativi rispetto a quelle di prima generazione, inoltre alcune risultano molto efficaci nei confronti di anaerobi come il *Bacteroides fragilis*, ma sono meno attive rispetto a quelle di prima generazione nei confronti dei Gram-positivi. Fanno parte di questa generazione la Cefoxitina, il Cefuroxime, il Cefaclor.

3. Cefalosporine di 3° generazione

sono Cefalosporine attive soprattutto sui Gram-negativi, sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e per questo vengono utilizzati nelle meningiti batteriche. Sono cefalosporine resistenti alle β -lattamasi e troviamo in questa generazione il Ceftriaxone, Cefotaxime, il Ceftazidime, il Cefixime.

4. Cefalosporine di 4° generazione

Anche questo tipo di cefalosporine sono in grado di passare la barriera ematoencefalica e sono attive sui Gram-negativi (come *Pseudomonas*) e in alcuni Gram-positivi. Troviamo il Cefepime.

5. Cefalosporine di 5° generazione

sono cefalosporine che vengono utilizzate nei confronti dei Gram-positivi e Gram-negativi e sono anche attivi nei confronti degli MRSA. Di questa generazione fanno parte il Ceftobipolo e la Ceftarolina.

Ceftarolina

La *Ceftarolina fosamil* è il profarmaco del metabolita attivo Ceftarolina, cefalosporina di quinta generazione, efficace nei confronti dei batteri Gram-positivi in particolar modo nei confronti degli MRSA. Il farmaco è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) ed utilizzato, sia negli adulti che nei bambini (con età superiore ai 2 mesi), nelle infezioni complicate della cute e dei tessuti molli (cSSTI) causate da ceppi sensibili alla meticillina, MRSA, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*.^{73,74}

È inoltre approvato l'utilizzo nella polmonite acquisita in comunità (CAP) causata da *Streptococcus pneumoniae*, *meticillina-sensibile*, *S. aureus (non-MRSA)*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *K. oxytoca*.⁷⁵

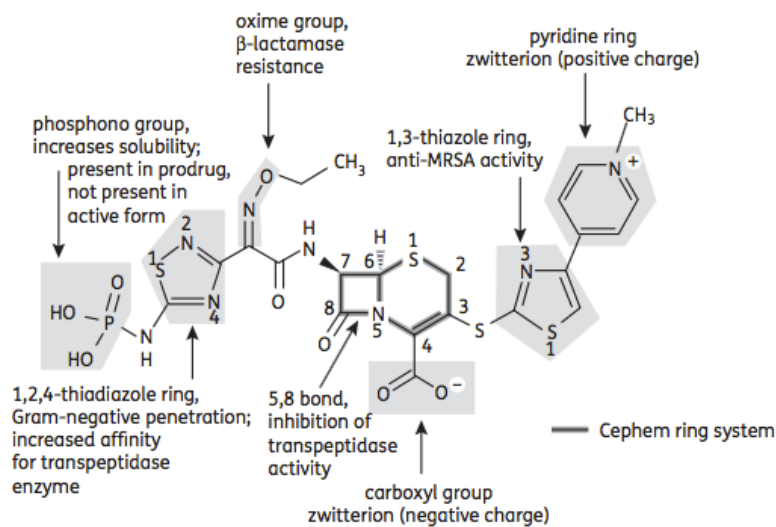


Fig.3 Struttura molecolare e attività della Ceftarolina. Laudano J. B.

La Ceftarolina è stata sviluppata modificando la struttura della cefalosporina Cefozopran di 4° generazione.⁷⁶ La forma non attiva, Ceftarolina fosamil, contiene un gruppo fosfato in grado di aumentare la solubilità in acqua, che viene rapidamente convertito nel plasma nella forma attiva, cioè la Ceftarolina.⁷⁷

L'anello 1,3-tiazolico attaccato alla posizione 3 del nucleo delle cefalosporine e il gruppo oxime nella porzione acilica C7 sono responsabili dell'attività della Ceftarolina nei confronti degli MRSA. (Fig.3)

La Ceftarolina, come gli altri β -lattamici, si lega alle proteine leganti la Penicillina (PBPs) per esercitare la sua azione battericida. Tuttavia presenta una maggiore affinità per il 3' della catena laterale delle PBPs nei patogeni come MRSA e pneumococchi resistenti alla Penicillina.

Ha un'alta affinità per le PBPs degli Stafilococchi e per la *pbp2a* degli MRSA con MIC 0,5-2 mg/L). In particolar modo si ritiene che l'elevata affinità per la *pbp2a* sia dovuta alla capacità della Ceftarolina di innescare un cambiamento conformazionale a livello della proteina favorendone l'esposizione del sito attivo per il legame.

La Ceftarolina fosamil è disponibile sotto forma di polvere sterile contenuta nei flaconcini monouso da 600 mg e 400 mg e deve essere ricostituita con 20 mL di acqua sterile e diluito ulteriormente con 250 mL di soluzione salina, soluzione di destrosio al 5%, soluzione di destrosio al 2,5% e soluzione di cloruro di sodio allo 0,45%.

La dose che viene somministrata è di 600 mg per via endovenosa in 1 ora ogni 12 ore negli adulti con età ≥ 18 anni. Nei soggetti con insufficienza renale da moderata a severa (CL_{CR} 30-50 mL/min) viene ridotta la dose a 400 mg per più di 1 ora ogni 12 ore.

Nei pazienti invece con una insufficienza renale grave (CL_{CR} 15-30 mL/min) la dose viene ridotta a 300 mg, somministrata per più di 1 ora ogni 12 ore.

Nell'insufficienza renale terminale e negli emodializzati la dose viene ridotta a 200 mg, somministrata per più di 1 ora ogni 12 ore.

FARMACOCINETICA DELLA CEFTAROLINA

Si è visto che in seguito alla somministrazione di una dose di 500 mg, la concentrazione plasmatica massima della Ceftarolina (C_{max}) è stata di 16,6 mg/L con un AUC dal tempo 0 all'infinito di 44,8 h \times mg/L e con un'emivita di 2,53 ore.

Nello studio a dosi multiple (giorno 1 a 14) in seguito alla somministrazione invece di una dose di 600 mg, la C_{max} al quattordicesimo giorno era di 21,3 mg/L con un AUC di 56,2 h \times mg/L e un'emivita di 2,66 ore.

La clearance renale della Ceftarolina dopo una singola dose è stata di 93,5 mL/min, mentre quella alla fine dello studio a dosi multiple è stata di 118,9 mL/min.

Inoltre essendo la Ceftarolina escreta per via renale si è visto che i pazienti con una insufficienza renale lieve (CL_{CR} 50-80 mL/min) non necessitano di un aggiustamento di dose, al contrario i pazienti con insufficienza renale da moderata a grave (CL_{CR} 15-30 mL/min) è raccomandato l'aggiustamento della dose.⁷⁸

Ceftobipolo

Il Ceftobipolo come la Ceftarolina è una cefalosporina di quinta generazione.

È stato approvato in Canada con il nome commerciale di ZefteraTM per le infezioni complicate della pelle (cSSSI), comprese le infezioni del piede diabetico in assenza di osteomielite.⁷⁹

Il ceftobipolo è una pirrolidinone-3-ilidene-metil-cefalosporina ed è attiva nei confronti sia dei Gram + che dei Gram negativi, incluse le specie resistenti come lo *Staphylococcus aureus* resistente alla Meticillina e lo *Streptococcus aureus* resistente alla Penicillina.

Il Ceftobipolo si lega alle PBPs e in particolar modo la catena laterale idrofobica C3 e consente il cambiamento conformazionale della pbp2a, inibisce la crescita cellulare e la morte della cellula batterica.⁸⁰

FARMACOCINETICA DEL CEFTOBIPROLO

La dose di Ceftobipolo che viene somministrata per via endovenosa è di 500 mg per 2 ore ogni 8 ore, mentre per i soggetti con infezioni da Gram + senza l'infezione da piede diabetico viene somministrata per 1 ora ogni 12 ore.

La concentrazione plasmatica massima del Ceftobipolo è di 29,2 mg/L con un AUC (area sotto la curva della concentrazione-tempo) da 0 a 8 ore di 90 h \times mg/L, mentre l'AUC da 0 a infinito è stata di 116 h \times mg/L.

3.2 Glicopeptidi

Sono una classe di antibiotici fra i quali troviamo la Vancomicina, la quale agisce legando il dipeptide D-Ala-D-Ala terminale della catena nascente del peptidoglicano dei batteri Gram-positivi. Ha una conformazione a "tasca" all'interno della quale si inserisce il dimero di D-Ala-D-Ala.

4. ANTIBIOTICO RESISTENZE

Con Antibiotico Resistenza (AMR) si intende l'insensibilità di un batterio ad un antimicrobico ed è un fenomeno naturale ed evolutivo, amplificato da una pressione selettiva.

Questo fenomeno può essere favorito da una serie di fattori: l'utilizzazione inadeguata di antimicrobici terapeutici, l'uso di antimicrobici a fini non terapeutici e l'inquinamento ambientale da antimicrobici accelerano l'apparizione nonché la propagazione di microorganismi resistenti e comportano gravi conseguenze.⁸¹

4.1 Resistenza ai β -lattamici

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 i β -lattamici (penicilline e cefalosporine). L'esempio classico è l'idrolisi dell'anello β -lattamico delle penicilline e delle cefalosporine ad opera di enzimi idrolitici, le β -lattamasi.⁸²

La resistenza ai β -lattamici si può sviluppare non solo con questo meccanismo, ma anche per mutazione delle PBP, rendendole meno affini ai β -lattamici, così come può avvenire tramite l'acquisizione di nuove PBP con bassa sensibilità all'antibiotico.

L'avvento della penicillina negli anni '40 ha migliorato in modo determinante la prognosi dei pazienti con infezioni da *S. aureus*, il cui livello di mortalità superava l'80%. È stato un risultato di breve durata poiché in poco tempo sono stati isolati ceppi di *S. aureus* penicillino-resistenti a causa dell'espressione delle β -lattamasi. I primi ceppi di *S. aureus* penicillino-resistenti sono comparsi negli ospedali intorno al 1942, con successiva diffusione nel resto della popolazione.

Dal 1950 in poi, più del 50% di tutti gli stafilococchi isolati erano resistenti alla penicillina.

Il meccanismo centrale nella resistenza agli antibiotici β -lattamici consiste nella produzione di β -lattamasi. Questi enzimi sono in grado di idrolizzare il legame amidico dell'anello β -lattamico delle penicilline e delle cefalosporine, con produzione di un derivato inattivo.

La produzione delle β -lattamasi è codificata dal gene *blaZ* e controllata rispettivamente dal sistema regolatore *BlaR-BlaI-BlaZ*.

Il gene *blaZ* è localizzato su un elemento trasponibile che solitamente può localizzarsi sia su plasmidi (anche di grandi dimensioni) che all'interno del cromosoma. È collegato a due geni regolatori adiacenti, l'antirepressor 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 il sito attivo della 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

penicillinasi) con i β -lattamici. L'evento che da inizio all'espressione della β -lattamasi è un'acilazione irreversibile, con l'apertura dell'anello β -lattamico, di un sito attivo di serina nel dominio 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. L'autoclivaggio del trasduttore di segnale è seguito da una propagazione proteolitica che si conclude con la proteolisi del repressore BlaI che dissociato dal suo sito di legame permette la trascrizione di blaZ/blaR/blaI. Il trasduttore di segnale del sistema regolatore dell'espressione di β -lattamasi è la proteina BlaR1, un recettore transmembrana.

BlaR1 di *S. aureus* è una proteina ad alto peso molecolare che lega le penicilline ed 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 reagiscono con il sito attivo della serina nel dominio C- terminale durante la reazione di acilazione della serina da parte di un β -lattamico che innesca una cascata di segnali che esitano 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 sono legati con legame non covalente e questa interazione è alterata dall'acilazione da parte dei β -lattamici.⁸³

Resistenza alla Meticillina

Nel 1950 è stato sviluppato il primo antibiotico meticillina semisintetico e nel 1960 è stato identificato il primo Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA).

Un clone di *S. aureus* resistente alla penicillina chiamato fago di tipo 80/81 principale responsabile di epidemie da *S. aureus* negli anni '50. Diffuso nei vari continenti (Australia, Regno Unito, Stati Uniti e Canada) fu responsabile di gravi infezioni cutanee, sepsi e/o polmonite.

Inizialmente i focolai epidemici erano limitati alle strutture ospedaliere, successivamente si diffuse anche in comunità. Questa pandemia è durata 10 anni, dopo di che è stata osservata una diminuzione del fago 80/81 grazie alla introduzione nel 1959 della Meticillina sul mercato.

Il meccanismo di resistenza presente nei ceppi MRSA è il risultato dell'acquisizione di un gene, il *mecA*, che codifica per la penicillin-binding-protein 2a (PBP2a), un PBP accessoria di 668 aminoacidi. In questo caso la resistenza si sviluppa tramite la produzione di una nuova PBP che possiede bassa affinità per le penicilline.

La resistenza conferita dal *mecA* è ad ampio spettro e quindi conferisce resistenza all'intera classe di farmaci β -lattamici. La regolazione della trascrizione di *mecA* è omologa a quella di *blaZ*. Anche in questo caso è presente un sistema regolatore composto dalla triade MecR, MecI, MecA.

La proteina MecR1 è omologa a BlaR1. Le somiglianze riguardano sia il meccanismo, sia le dimensioni che la sequenza. 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 porta all'espressione della PBP2a, né viceversa l'attivazione di MecR1 all'espressione della β -lattamasi.

I ceppi di stafilococco che esibiscono una resistenza per la produzione di β -lattamasi o per la presenza di PBP2a (o entrambe) sono diventati un'importante problema per le infezioni indotte da questi batteri resistenti.

La resistenza ai β -lattamici è rilevabile attualmente in più del 95% degli stafilococchi isolati, mentre i ceppi di *S. aureus* Meticillino-resistenti (MRSA) costituiscono il 25- 50% degli isolati clinici in Nord America, Europa e Asia.⁸⁴

L'MRSA è ora diventato a livello globale un rischio ben noto di ricovero ospedaliero nelle persone immunocompromesse e un enorme problema di igiene e sanità pubblica.

Il primo caso australiano di infezione da MRSA fu riportato a Sydney nel 1965, dopo di che furono riportate segnalazioni di infezioni sporadiche da MRSA nosocomiali (HA-MRSA) a Melbourne e in altre città.^{85,86}

L'Australia occidentale è rimasta MRSA-free fino alla comparsa di un ceppo MRSA resistente alla gentamicina non multidrug (MDR) in una remota regione settentrionale alla fine degli anni '80⁸⁷ e da lì si diffuse rapidamente nel resto dell'Australia occidentale.

Negli Stati Uniti la prima epidemia ospedaliera di MRSA è stata dichiarata nel 1968 a Boston.⁸⁸

Successivamente è diventato gradualmente un patogeno endemico nei grandi ospedali degli Stati Uniti e principalmente nelle unità di terapia intensiva. La percentuale di isolati di MRSA da pazienti ospedalizzati negli Stati Uniti è passata dal 2,4% al 29% dal 1975 al 1991.⁸⁹

Dall'inizio del 1998 alla metà del 2003 la percentuale media annuale è aumentata ulteriormente al

51,6% per i pazienti in terapia intensiva e al 42% nei pazienti ricoverati non in terapia intensiva.⁹⁰ In Giappone infezioni da MRSA negli ospedali si sono verificate alla fine degli anni '80. La frequenza dei pazienti con MRSA è aumentata dal 3,8% nel 1990 al 9,6% nel 1994. Di tutti i pazienti colonizzati con MRSA, i pazienti ambulatoriali rappresentavano il 4,5% nel 1990 e il 35% nel 1994 con successiva diffusione di MRSA nella comunità (CA-MRSA) dal 2003.⁹¹

Elementi genetici di resistenza

La resistenza alla Meticillina dello *S. aureus* è legata all'acquisizione di un gene di resistenza, *mecA*, che è trasportato su un elemento genetico mobile, la **cassetta cromosomica SCCmec**, che comprende un gruppo di elementi mobili di DNA, di dimensioni 21–67 kb, che sono integrati nel cromosoma di *S. aureus* in un sito unico, attBsc, a valle di una Open Reading Frame, orfX.⁹²

Tutti i tipi di SCCmec contengono frammenti di DNA specifici utilizzati per la loro classificazione e due complessi genici: “mec gene complex” e “ccr gene complex”.

Tutti i complessi mec contengono il gene *mecA*, una copia di IS431 (trasposone), i geni regolatori di *mecA* completi o troncati, *mecI* e *mecR1* e due ORF adiacenti.⁹³

SCCmec può contenere anche altre strutture genetiche, come Tn554, pT181 e pUB110, che sono responsabili del conferimento della resistenza ad altri farmaci non β-lattamici.⁹⁴

L'elevata diversità nell'organizzazione strutturale e il contenuto genetico di queste cassette geniche ha portato alla loro classificazione in tipi e sottotipi.

✓ mec gene complex

Il complesso del gene *mec* è composto dal gene *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC* e / o *mecD*), dai suoi componenti regolatori (inclusi *mecR1* e *mecI*) e dalle sequenze di inserzione associate (IS). Sulla base delle differenze nelle sequenze di inserzione e degli elementi regolatori a monte e a valle del gene *mec*, il complesso del gene *mec* è stato classificato in 5 diverse classi (da A a E).^{95,96,97} (Fig.4)

La **classe A** è composta dal *mecA*, il *mecR1* completo e *mecI* a monte di *mecA*. A valle di *mecA* include la regione ipervariabile (HVR) e la sequenza di inserzione IS431.

Class A mec
SCCmec II (N315)



La **classe B** è costituita da IS1272, *mecA*, *mecR1* troncato (Δ *mecR1*), HVR e IS431.

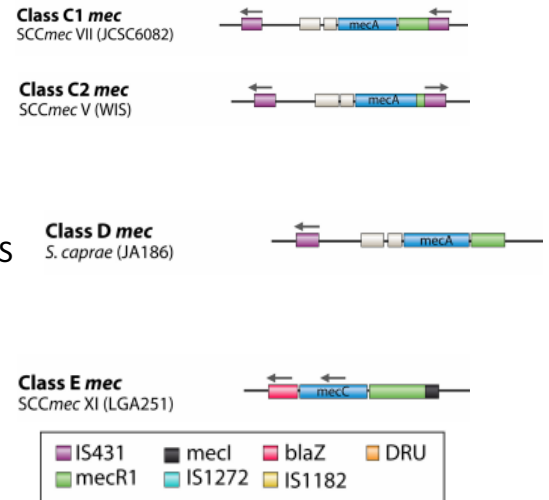
Class B mec
SCCmec I (NCTC10442)



La **classe C** è composta da IS431, *mecA*, Δ *mecR1*, HVR e IS431.

Esistono due versioni distinte del complesso del gene *mec* di classe C, denominate classe C1 e classe C2, in base all'orientamento di IS431.

Nella classe C1, IS431 a monte e a valle di *mecA* hanno lo stesso orientamento, mentre nella classe C2 gli orientamenti di IS431 sono invertiti e quindi nella direzione opposta.



La **classe D** trasporta IS431, *mecA* e *mecR1* troncato ma nessun IS a valle di Δ *mecR1*.

La **classe E** è composto da *blaZ*, *mecC*, *mecR1* e *mecI*.

Fig.4 Varianti del complesso del gene *mec*. Lakhundi S.

✓ **ccr gene complex**

I geni *ccr* insieme agli “open reading frame” (ORF), costituiscono il complesso del gene *ccr*.

La corretta integrazione e / o escissione di SCCmec nel cromosoma di un ceppo di stafilococco viene catalizzata tramite le ricombinasi CcrAB e / o CcrC, che sono responsabili della catalizzazione della scissione del DNA e dello scambio di filamenti e della ricombinazione di due siti di attacco.^{98,99}

A livello di SCCmec esiste il sito di attacco attSCC, mentre il sito attB si trova sul cromosoma batterico. Le ripetizioni invertite presenti su entrambi i lati di SCCmec svolgono anche un ruolo nell'escissione dell'elemento ma non nell'integrazione. A valle e a monte di attB ci sono delle sequenze da 100 a 200 bp che determinano la velocità e l'efficacia dell'inserimento di questi elementi.

✓ **Regione J**

Sono delle regioni diverse dal *ccr* gene complex e *mec* gene complex, queste componenti non sono essenziali e possono contenere dei determinanti di resistenza antibiotica. In base alla loro posizione all'interno dell'elemento SCCmec sono classificati come J1, J2, J3.

La regione J1 (precedentemente chiamata regione L-C) è la regione situata tra la giunzione cromosomica destra e il gene *ccr*, cioè a monte del gene *ccr*.

La regione J2 (precedentemente chiamata regione C-M) è la regione tra il complesso del gene *ccr* e il complesso del gene *mec*.

La regione J3 (precedentemente nota come regione I-R) si trova tra il complesso genico *mec* e la giunzione cromosomica sinistra, cioè a valle del gene *mec*.

La regione J1 include spesso diversi ORF e geni regolatori, mentre J2 contiene elementi genetici come il gene integrasi o il trasposone Tn554. J3 spesso include la resistenza ad antibiotici come le tetracicline, gli aminoglicosidi etc. La variazione nel segmento del DNA della regione J è la base per la distinzione dei diversi sottotipi di SCCmec.

Cassetta cromosomica SCCmec

Ad oggi ci sono un totale di 13 tipi di SCCmec identificati nei ceppi di MRSA e quelli più osservati vanno dal tipo I al IV.¹⁰⁰ (Fig.5)

✓ SCCmec tipo I:

è stata descritta per la prima volta nel 2001 nel ceppo MRSA NCTC10442, isolato nel Regno Unito nel 1961.¹⁰¹ Successivamente è stata identificata anche nei ceppi MRSA proveniente da Malesia, Sudafrica, Italia e successivamente in tutto il mondo, soprattutto in ambito nosocomiale. È costituito dal complesso del gene *mec* di classe B (IS1272- *mecR1*-*mecA*-IS431), dal complesso del gene *ccr* di tipo 1 (*ccrA1* e *ccrB1*) e da un regolatore *pIs* nella regione J1 dell'elemento. Nella regione J3 è presente il plasmide pUB110 insieme ad una delezione parziale della regione ipervariabile.

La SCCmec del ceppo NCTC10442 è lunga 34.359 nucleotidi e contiene 4 regioni ripetute, 2 elementi mobili e 41 sequenze di DNA codificanti (CDS). L'intero elemento è strutturalmente diviso nella regione a monte del complesso genico *ccr*, contenente una regione ripetuta e 17 CDS. Il complesso genico *ccr* è costituito dai geni *ccr* e da 7 CDS, mentre il complesso genico *mec* di classe B ha 10 CDS e a valle del complesso genico *mec* c'è una regione ripetuta e 3 CDS.

È presente anche una sequenza di ripetizione invertita lunga 22 bp ad entrambe le estremità della cassetta genica.

✓ SCCmec tipo II:

è stata descritta per la prima volta nel 1999 nel ceppo MRSA N315 ed è stata principalmente riscontrata nei ceppi MRSA (HA-MRSA). SCCmec tipo II ha il complesso di geni *mec* di classe A, un complesso di geni *ccr* di tipo 2, una copia integrata di plasmide stafilococcico pUB110 nella regione J3 e un regolatore *kdp* nella regione J1. Ha una lunghezza di 53.017 nucleotidi e contiene 4 regioni ripetute, 3 elementi mobili e 51 CDS. L'intero elemento è suddiviso nella regione a monte del complesso del gene *ccr* contenente una regione ripetuta e 15 CDS, il complesso di gene *ccr* costituito dai geni *ccr* e 6 CDS, la regione tra il complesso del gene *ccr* e il complesso genico *mec* costituita da un elemento mobile e 12 CDS, il complesso genico *mec* di classe A con 5 CDS, e infine la regione a

valle del complesso del gene *mec* con 1 elemento mobile, 2 regioni ripetute e 8 CDS. Ci sono anche delle ripetizioni invertite ad entrambe le estremità della cassetta genica.

✓ **SCCmec tipo III:**

è stata scoperta per la prima volta in Nuova Zelanda nell'isolato 85/2082 nel 2001 e, come con i tipi I e II, si trova prevalentemente nei ceppi HA-MRSA.

SCCmec III porta un complesso di geni *mec* di classe A, un complesso di geni *ccr* di tipo 3 e, nella regione J3, una copia integrata del plasmide pT181 che codifica per la tetraciclina e la resistenza al mercurio. Ha una lunghezza di 66.896 nucleotidi e contiene 10 sequenze ripetute, 6 elementi mobili e 97 CDS. L'intero elemento è suddiviso strutturalmente nella regione a monte

del complesso del gene *ccr* contenente una regione ripetuta e 2 CDS. Il complesso del gene *ccr* è costituito dai geni *ccr* e 11 CDS, la regione tra il complesso del gene *ccr* e il

complesso genico *mec* formato da un elemento mobile e 18 CDS, il complesso genico *mec* di classe A con 9 CDS, 1 elemento mobile e 2 regioni ripetute, e infine la regione a valle del complesso del gene *mec* con 4 elementi mobili, 7 regioni ripetute e 52 CDS. Gli elementi di tipo III portano anche le ripetizioni caratteristiche invertite a entrambi le estremità. A differenza del tipo I e II, il tipo III presenta diversi geni di resistenza agli antibiotici nella regione J.

Nella regione J2 si trova un trasposone, Tn554, che codifica per i determinanti della resistenza al cadmio.

Nella regione J3 è presente una copia del plasmide pT181 che porta geni di resistenza alla tetraciclina e al mercurio, un trasposone, Tn554, che codifica per la resistenza all'eritromicina e alla spectinomomicina. Ha una dimensione di 67 kb, infatti è stato considerato l'elemento più lungo anche se è stato dimostrato nel 2006 che l'elemento di tipo 3 è composto da due elementi SCC più piccoli integrati in tandem: SCCHg (che sta per mercury) e SCCmec di tipo 3 che trasporta complessi genici *ccr* di tipo 3 e *mec* di classe A.

✓ **SCCmec tipo IV:**

è stata scoperta per la prima volta nel 2002 in due ceppi MRSA caratteristici, CA05 e 8/6-3p, isolati dal liquido articolare dei pazienti. È stato riscontrato in 2 ceppi CA-MRSA.

SCCmec IV è la più piccola ed è costituita da un complesso di geni *mec* di classe B con un complesso di geni *ccr* di tipo 2 e ospita il trasposone Tn4001 nella regione J3. Questa cassetta è costituita da 24.244 nucleotidi con 4 regioni ripetute, 2 elementi mobili e 22 CDS. L'intero elemento è suddiviso

da una regione a monte del complesso del gene *ccr* contenente una regione ripetuta e 4 CDS, il complesso del gene *ccr* è costituito dai geni *ccr* e 6 CDS, il complesso genico *mec* di classe B con 5 CDS, 2 elementi mobili e 2 regioni ripetute, e infine la regione a valle del *mec* complesso genico avente 1 regione ripetuta e 3 CDS.

La cassetta SCCmec tipo IV di 8 / 6-3p è lunga 20.916 bp ed ha le stesse caratteristiche di CA05 con l'eccezione della regione J1 e per questo risulta essere un sottotipo differente.

La composizione genetica della regione varia molto infatti ci sono diversi sottotipi (a-n)

Entrambe le estremità ancora una volta sono caratterizzate da sequenze ripetute e invertite. A causa delle dimensioni più piccole e alla composizione genetica più semplice, non vi sono geni di resistenza agli antibiotici ad eccezione del *mecA*.

✓ **SCCmec tipo V:**

è stata identificata per la prima volta nel 2004 nel ceppo australiano WIS (JCSC3624) e si trova nei CA-MRSA. È costituita da un complesso di geni *mec* di classe C2 e un complesso di geni *ccr* di tipo 5.^{102,103} Ha una lunghezza di 27.638 bp con 6 regioni ripetute, 2 elementi mobili e 23 CDS.

L'intero elemento è strutturalmente diviso in una regione a monte del complesso di geni *mec* contenente una regione ripetuta e 1 CDS, il complesso genico *mec* di classe B con 4 CDS, 2 elementi mobili e 4 regioni ripetute, la regione tra il complesso del gene *mec* e il complesso del gene *ccr* con 2 CDS, il complesso di geni *ccr* con i geni *ccr* e 6 CDS, il complesso del gene *mec* e infine la regione a valle del complesso del gene *ccr* con 1 regione ripetuta e 7 CDS. La ricombinazione di questo tipo di elemento SCCmec non viene effettuata né da *ccrA* né da *ccrB* ma da a nuovo gene *ccrC*. Quindi, l'integrazione e l'escissione sono causate da una singola cassetta cromosoma ricombinasi C (*ccrC*). Non possiede altri geni di resistenza agli antibiotici, con l'eccezione di *mecA*.

✓ **SCCmec tipo VI:**

è stata scoperta per la prima volta nel 2001 nel ceppo HDE288 isolato da un ospedale pediatrico in Portogallo.^{104,105,106}

È formata dal complesso di geni *mec* di classe B e dal complesso di geni *ccr* di tipo 4.

È l'unico elemento di cui non si conosce ancora la sequenza completa.

✓ **SCCmec tipo VII:**

Identificata per la prima volta in un ceppo CA-MRSA svedese JCSC6082 nel 2008.¹⁰⁷ È costituita dal complesso di geni *mec* di classe C1 e il complesso di geni *ccr* di tipo 5. Ha una dimensione di 26.753

nucleotidi con 2 regioni ripetute e 29 CDS. Questa cassetta genica è divisa da una porzione a monte del complesso di geni *ccr* contenente una regione ripetuta e 3 CDS, poi c'è il complesso di geni *ccr* contenente i geni *ccr* e 6 CDS. La regione tra il complesso genico *ccr* e il complesso genico *mec* è costituita da 8 CDS, il complesso genico *mec* di classe C1 e 4 CDS. Infine c'è una regione a valle del complesso del gene *mec* che è costituita da una regione ripetuta e 5 CDS.

✓ **SCCmec tipo VIII**

è stata segnalata per la prima volta in un ceppo MRSA canadese, il C10628, nel 2009 ed è uno dei ceppi predominanti in Canada. È costituita da un complesso del gene *mec* di classe A e dal complesso di geni *ccr* di tipo 4. Ha una lunghezza di 32.184 bp con 6 regioni ripetute, 1 elemento mobile e 36 CDS. La cassetta genica è suddivisa in una regione a monte del complesso del gene *mec* contenente 2 regioni ripetute e 2 CDS, poi c'è il complesso del gene *mec* di classe A con 6 CDS, 1 elemento mobile e 2 regioni ripetute. La regione tra il complesso del gene *mec* e il complesso del gene *ccr* è formata da 19 CDS. Inoltre è presente il complesso del gene *ccr* con i geni *ccr* e la regione a valle del complesso del gene *ccr* che è costituita da 2 regioni ripetute e 5 CDS.

SCCmec di tipo VIII è affiancato da due regioni palindromiche: DyaR-L e DyaR-R, che distano 97 nucleotidi dalle ripetizioni dirette dell'SCCmec, ovvero DRSCC-L e DRSCC-R.

✓ **SCCmec tipo IX:**

è stata identificata nel ceppo MRSA JCSC6943. Il sequenziamento dell'elemento ha rivelato che porta un complesso del gene *mec* di classe C2 e un complesso del gene *ccr* di tipo 1. È costituita da 43.710 nucleotidi con 6 regioni ripetute, 2 elementi mobili e 42 CDS.

L'intero elemento è strutturalmente diviso nella regione a monte del complesso del gene *ccr* contenente una regione ripetuta e 3 CDS, il complesso del gene *ccr* avente geni *ccr* e 6 CDS, la regione tra il complesso del gene *ccr* e il complesso del gene *mec* con 5 CDS, il complesso del gene *mec* di classe C2 oltre a 5 CDS, 2 elementi mobili e 4 regioni ripetute, infine la regione a valle del complesso genico *mec* avente 1 regione ripetuta e 20 CDS.

L'elemento è affiancato da due sequenze ripetute dirette ad entrambe le estremità.

Delle regioni J, J1 è unica e complicata perché è coinvolta nella disintossicazione di cadmio, rame e arsenico, contiene l'operone *cadDX*, il gene *copA* (correlato alla disintossicazione da rame) e due operoni coinvolti nella resistenza all'arsenico: *arsRBC* e *arsDARBC*.

✓ **SCCmec tipo X:**

è stata identificata insieme al SCCmec di tipo IX nel ceppo MRSA JCSC6945 ed è costituita dal complesso di geni *mec* di classe C1 e il complesso di geni *ccr* di tipo 7.

Ha una lunghezza di 50.802 nucleotidi con 6 regioni ripetute, 2 elementi mobili e 54 CDS.

L'intero elemento è diviso strutturalmente nella regione a monte del complesso del gene *mec* contenente 1 regione ripetuta e 6 CDS, il complesso del gene *mec* di classe C1 con 5 CDS, 2 elementi mobili e 4 regioni ripetute. La regione tra il complesso del gene *mec* e il complesso del gene *ccr* è costituita da 4 CDS, poi c'è il complesso del gene *ccr* formato dai geni *ccr* e 5 CDS. Infine è presente la regione a valle del complesso del gene *ccr* con 1 regione di ripetizione e 30 CDS. Esistono molte somiglianze nelle strutture di SCCmec tipo X e SCCmec tipo IX che includono le ripetizioni dirette su entrambi i lati dell'elemento, due regioni IS431 affiancate dai geni *tnp*, dal gene *ccrA1* e dai geni relativi alla disintossicazione da metalli pesanti, inclusi l'operone *cadDX* e il gene *copA*. Nella regione J3 è presente anche l'operone *arsRBC* che è molto simile all'operone *arsRBC* nella regione J1 di SCCmec tipo IX. Inoltre nella regione J1 è presente anche un operone *arsRBC*, oltre a una sequenza di inserzione ISSha1.

✓ **SCCmec tipo XI:**

è stata identificata nel 2011 contemporaneamente nei ceppi MRSA LGA251 e M10 / 0061 isolati rispettivamente nel sud-ovest dell'Inghilterra nel 2007 e nel sud-est Irlanda nel 2010.¹⁰⁸ È formata da un complesso di geni *mec* di classe E, che trasporta il gene *mecC*, e un complesso genico *ccr* di tipo 8. Ha una lunghezza di 29,4 kb e ha un'ampia distribuzione in Europa con un ampio reservoir come gli animali da compagnia, bestiame e fauna selvatica, che possono essere tutti potenziali fonti di infezioni umane.

SCCmec tipo XI di LGA251 contiene 29 CDS. Il gene *mec* invece è diverso dagli altri omologhi e quindi viene considerato come un allotipo unico.

✓ **SCCmec tipo XII:**

È stata riscontrata nell'isolato BA01611 di *S. aureus*.

Il ceppo è stato isolato da un campione di mastite bovina raccolto dalla Cina nord-occidentale.

SCCmec tipo XII è un composito costituito da uno pseudo-SCC e un SCCmec intatto.

Questo SCC composito, tuttavia, non contiene alcun gene di resistenza agli antibiotici ad eccezione del *mecA*. Si stima che l'elemento abbia una dimensione di 25 kb, delimitato da due sequenze ripetute dirette DR2 e DR3, con 31 ORF. È costituito da un nuovo allotipo *ccrC* chiamato *ccrC2*.

Inoltre sono state riscontrate due subunità di restrizione modificate nel sistema di metilazione, che generalmente sono molto rare in *S. aureus*.

Questa cassetta genica porta 30 ORF a valle di *orfX*. È lungo circa 24,3 kb ed è delimitato da DR1 e DR2. Inoltre è presente il complesso di geni *ccr* di tipo 1 con *ccrA1* troncato.

✓ **SCCmec tipo XIII:**

è stata identificata nel ceppo MRSA ST152, isolato da un maschio danese di 30 anni con una batteriemia. La cassetta genica ha una lunghezza di 32,3 kb e ospita un nuovo gene *ccrC2*. La struttura del complesso genico *mec* assomiglia al complesso di classe A (*mecl-mecR1-mecA-IS431*) con un IS431 in più a valle di *mecl*. Inoltre, l'ordine dei geni nel complesso genico *mec* di SCCmec di tipo XIII è invertito e contiene un gene di resistenza alla gentamicina sul trasposone Tn4001, trovato nella regione J2 dell'elemento.

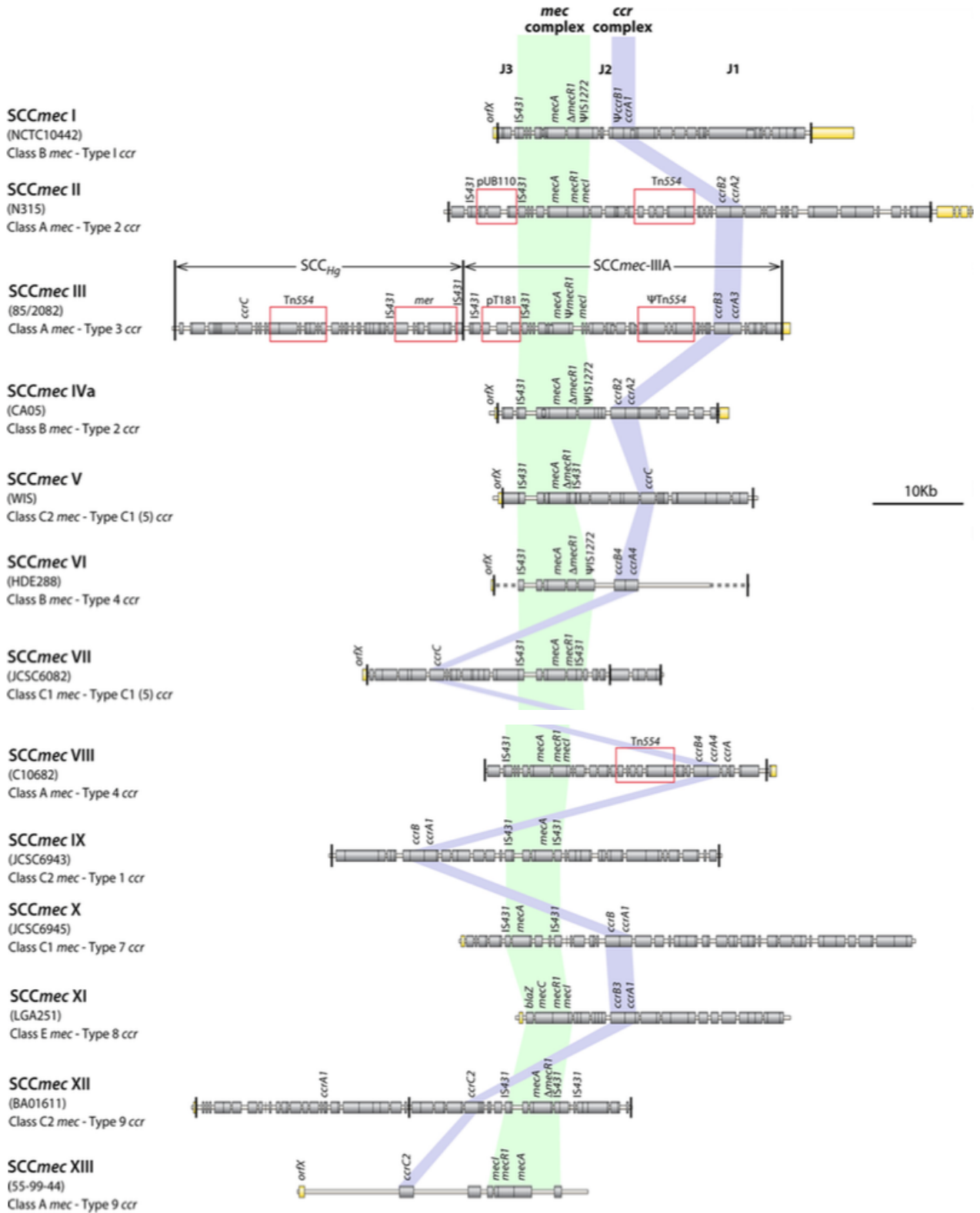


Fig.5. Cassette cromosomiche SCCmec. *Lactococcus lactis*.

Resistenza alla Ceftarolina

È stato dimostrato che la ceftarolina ha un'alta affinità per le PBP stafilococciche 1, 2, 3, per il PBP2a degli MRSA.

Si ritiene inoltre che l'elevata affinità della Ceftarolina nei confronti di PBP2a negli MRSA sia aiutata dalla capacità della Ceftarolina di innescare un cambiamento conformazionale nella proteina causando l'esposizione del sito attivo per il legame.

Nei ceppi MRSA resistenti alla Ceftarolina sono state riscontrate diverse mutazioni a livello delle PBP2a: N146K, H351N, Y446K, E447K, E239K.¹⁰⁹

La presenza di mutazioni a livello della PBP4 e a livello della *gdpP* (fosfodiasterasi), anche in assenza di gene *mecA*, determina alti livelli di resistenza nei confronti degli antibiotici beta-lattamici.¹¹⁰

Resistenza Ceftobiprololo

La resistenza nei confronti del Ceftobiprololo è dovuta a mutazioni nei geni *pbp*, in particolare *pbp4* o *mecA*.^{111,112}

In particolar modo in alcuni ceppi MRSA resistenti al Ceftobiprololo sono state riscontrate diverse mutazioni:

- N146K, S225R nella PBP2a a livello del dominio non-penicillin binding domain (non-PBD)
- S194N, S629T, D118N, A329V, E499D, G515S nella PBP1
- C197Y, L256V, P285A, T439V, Q358H, V607M nella PBP2
- R504K, K584F, P233L, S438T, A330S nella PBP3
- N337D, D98E, S189T, E398A, V210I, E183A, F241R nella PBP4

4.2 Resistenza alla Vancomicina

L'aumento delle infezioni da MRSA ha portato ad un maggiore utilizzo della vancomicina e quindi alla comparsa di ceppi di *S. aureus* vancomicina-intermedi (VISA) e ceppi di *S. aureus* vancomicina-resistenti (VRSA). Sono ceppi che vengono inibiti solo a concentrazioni rispettivamente superiori a 4-8 µg / ml e 16 µg / ml.

La resistenza si verifica quando si forma un precursore alterato del peptidoglicano costituito dal dimero D-Ala-D-Lac o il dimero D-Ala-D-Ser e non più dal dimero D-Ala-D-Ala che impedisce il legame della Vancomicina.¹¹³

5. SCOPO DEL LAVORO

L'antibiotico resistenza è un fenomeno naturale nell'evoluzione dei batteri, è accentuato dall'utilizzo spesso eccessivo e inappropriato degli antimicrobici e porta alla selezione di microrganismi resistenti e successivamente alla loro diffusione.

Ad oggi MRSA rappresenta uno dei principali problemi di sanità pubblica ed in Italia il 34% degli *S.aureus* isolati in infezioni invasive sono resistenti alla meticillina.¹¹⁴

Lo scopo di questo lavoro è quello di caratterizzare i ceppi MRSA isolati da campioni clinici provenienti da due ospedali (Ospedale Riuniti di Ancona e Ospedale E. Profili di Fabriano) e valutare l'efficacia nei loro confronti di una nuova cefalosporina di quinta generazione, la Ceftarolina.

I ceppi risultati resistenti e intermedi sono stati sequenziati per l'identificazione delle mutazioni responsabili del fenotipo di resistenza e successivamente tipizzati per identificare una possibile origine clonale dei ceppi.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Terreni di coltura

I terreni di coltura utilizzati sono stati principalmente due:

Mannitol Salt Agar (o Chapman): è un terreno selettivo per l'isolamento degli Stafilococchi in particolar modo per lo *S. aureus*. La capacità selettiva è data dall'alta concentrazione di NaCl (7,5%) che inibisce la crescita di moltissimi microrganismi ad eccezione degli Stafilococchi.

Inoltre lo *S. aureus* viene identificato anche dalla sua capacità di fermentare il Mannitolo che provoca una riduzione del pH e un conseguente un viraggio del colore del terreno da rosso a giallo. Oltre al Mannitolo, al Rosso Fenolo (indicatore di pH), al sale (agente selettivo), il terreno contiene anche l'estratto di carne (fonte di azoto e altri nutrienti) e Peptone (fonte di azoto e altri nutrienti).

Mueller-Hinton Agar: è un terreno che viene utilizzato per la valutazione della sensibilità degli antibiotici grazie alla sua caratteristica di essere un terreno non selettivo, che contiene un estratto di manzo, caseina e amido.

6.2 Raccolta dei campioni e valutazione della sensibilità dei ceppi isolati alla Ceftarolina

Sono stati raccolti 239 ceppi di MRSA, isolati da diversi campioni clinici in agar sangue. Successivamente sono stati seminati (con l'utilizzo della tecnica per isolamento) su Chapman (terreno selettivo per gli Stafilococchi) che permette sia di ottenere una coltura "pura", cioè derivata da una singola colonia, sia di identificare lo *S. aureus*. La conferma dell'identificazione di specie è avvenuta mediante Vitek-II.

Gli MRSA sono stati testati nei confronti della Ceftarolina attraverso l'esecuzione di un antibiogramma utilizzando il metodo **Kirby-Bauer** (metodo qualitativo) con due tipologie diverse di dischetto:

- il dischetto da 5 µg/ml secondo direttive EUCAST
- il dischetto da 30 µg/ml secondo direttive CLSI

La metodica prevede la preparazione di una sospensione standardizzata dell'inoculo batterico in modo da ottenere una specifica concentrazione batterica di 1×10^8 UFC/ml. Per la preparazione della sospensione viene utilizzato uno spettrofotometro che permette di misurare la torbidità della brodocoltura batterica. Una assorbanza compresa tra 0,080-0,120 corrisponde ad una concentrazione di 1×10^8 UFC/ml.

A questo punto si procede alla semina del campione sulla superficie di un terreno, il Mueller-Hinton Agar, utilizzato proprio per valutare la sensibilità agli antibiotici grazie alla sua caratteristica di essere un terreno non selettivo, attraverso l'utilizzo di un tampone sterile che viene imbevuto all'interno

della provetta contenente l'inoculo e premuto lungo le pareti in maniera tale da rimuovere l'eccesso di sospensione batterica. Il tampone viene passato sulla superficie dell'agar per depositare una patina batterica al di sopra della piastra Petri.

Dopo la semina si procede con la disposizione dei dischetti imbevuti dell'antibiotico Ceftarolina sul terreno, i quali devono essere posizionati ad una distanza tale da impedire la sovrapposizione degli aloni di inibizione che si formano intorno al dischetto in seguito ad incubazione overnight (18-24 h) a 37°C.

Il giorno seguente si va a calcolare il diametro dell'alone di inibizione (unità di misura millimetri) formatosi attorno al dischetto. I risultati ottenuti in vitro (endpoints) vengono confrontati con i valori soglia (breakpoints) stabiliti grazie a due sistemi di standardizzazione differenti CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) e EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) per ciascuna combinazione MRSA-antibiotico.^{115,116}

Questi breakpoints consentono di interpretare criticamente ciascun risultato e dunque di stabilire se il ceppo microbico in esame risulta sensibile, intermedio o resistente a quella determinata concentrazione di antibiotico.

Quando il ceppo è **sensibile** (diametro ≥ 20 dischetto da 5 $\mu\text{g/ml}$ e ≥ 24 dischetto da 30 $\mu\text{g/ml}$) significa che il livello di attività dello specifico antibiotico nei confronti di un determinato microrganismo risulta associato ad una elevata probabilità di successo terapeutico, al contrario un ceppo è **resistente** (diametro ≤ 17 dischetto da 5 $\mu\text{g/ml}$ e ≤ 20 dischetto da 30 $\mu\text{g/ml}$) quando il livello dello specifico antibiotico nei confronti di un determinato microrganismo risulta associato ad una elevata probabilità di fallimento terapeutico.

Quando risulta **intermedio** (diametro compreso tra 17-19 dischetto da 5 $\mu\text{g/ml}$ e 20-24 dischetto da 30 $\mu\text{g/ml}$) invece si ha a che fare con un valore borderline, cioè l'efficacia dell'antibiotico nei confronti di quel ceppo potrebbe essere minore rispetto a quella registrata per gli isolati sensibili.

I ceppi che sono risultati resistenti e intermedi sono stati confermati con un altro metodo di determinazione della suscettibilità agli antibiotici, l'**E-test**, più costoso ma di rapida esecuzione, che oltre ad un risultato di tipo qualitativo fornisce un valore quantitativo della sensibilità dell'antibiotico. Il procedimento è molto simile a quello dell'antibiogramma Kirby-Bauer, l'unica differenza che si riscontra sta nel fatto che al posto dei dischetti viene posizionata sul terreno Mueller-Hinton una striscia graduata (gradiente di antibiotico con il valore massimo all'estremità della striscia) imbevuta dell'antibiotico in questione. Dopo l'incubazione overnight si osserva la formazione di un caratteristico alone di inibizione di forma ellittica e il punto in cui si verifica la sua

intersezione corrisponde proprio al valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC) specifico per il ceppo in esame.

6.3 Estrazione del DNA dei ceppi CPT-non suscettibili

L'estrazione del DNA è stata effettuata con un apposito kit della Thermo Scientific "*GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit*" e seguendo i vari passaggi del protocollo per l'estrazione dei Gram-positivi:

1. per prima cosa viene preparato il Lysis buffer costituito da: 20 mM di Tris-HCl, 2mM EDTA, 1,2% Triton X-100, e il Lisozima subito prima dell'uso. Inoltre per gli Stafilococchi viene aggiunta anche la Lisostafina 100 µl/mL;
2. si raccoglie dalla piastra una colonia di batteri, circa 2×10^9 , e si stempera in una provetta da 1,5 mL all'interno della quale prima viene messo 1mL di acqua;
3. si centrifuga per 10 minuti a 5000 RPM e si elimina il sovrnatante, in questo modo si trova la colonia batterica depositata sul fondo della provetta;
4. si risospende la colonia batterica con 180 µl di Lysis buffer preparato precedentemente e si incuba per 30 minuti/ 1 ora nel bagno termostatico a 37°C;
5. si aggiunge a questo punto 200 µl di Lysis Solution e 20 µl di Proteinasi K e si meschia il tutto con una pipetta affinché non si ottiene una sospensione omogenea. Questi passaggi servono per degradare le componenti strutturali dello Stafilococco;
6. la provetta viene incubata a 56°C nel bagno termostatico per circa 30 min;
7. a questo punto si aggiunge 20 µl di RNasi A, si rimescola con la pipetta e si lascia a temperatura ambiente per 10 min;
8. si aggiunge 400 µl di etanolo al 50% e si mescola, poi si trasferisce il preparato lisato nella colonnina contenente una membrana filtrante e inserita in una provetta, fornite entrambe dal kit. Si centrifuga per 1 minuti a 6000 RPM e si elimina la provetta contenente il filtrato. In questo modo il DNA rimane legato alla membrana della colonnina e mentre tutte le componenti cellulari degradate vengono eliminate;
9. la colonnina viene inserita in una nuova provetta da 2 mL e si aggiunge 500 µl di Wash Buffer I aggiunto di etanolo, si centrifuga per 1 minuti a 8000 RPM e si elimina il filtrato senza buttare via la provetta da 2mL;
10. si aggiunge 500 µl di Wash Buffer II aggiunto di etanolo e si centrifuga di nuovo per 3 minuti al massimo degli RPM (> di 12000) e si rimuove di nuovo il filtrato. Nel caso in cui sono rimasti

dei residui di filtrato viene fatta di nuovo una centrifugazione per 1 minuto al massimo degli RPM;

11. a questo punto si aggiunge 200 µl di Elution Buffer al centro della membrana presente nella colonnina, si incuba per 2 minuti a temperatura e si centrifuga per 1 minuti a 8000 RPM.

Questo passaggio viene ripetuto due volte per raccogliere tutto il DNA che si distacca dalla membrana della colonnina.

6.4 Amplificazione campioni mediante PCR

Il DNA estratto è stato utilizzato per ricercare la presenza dei geni *mecA*, *PBP1*, *PBP2*, *PBP3*, *PBP4*, *gdpP*, coinvolti nella sintesi della parete e principale target delle mutazioni che conferiscono resistenza alla Ceftarolina. I primer utilizzati per l'amplificazione di questi geni sono riportati in tabella 1.

<i>mecA</i> -FW	ATAGTTGTAGTTGTCGGGTT
<i>mecA</i> -RV	TATCGTATTTTTTATTACCGTT
SA_pbp1-FW	ATCGTAATGGTAAAGTGCTA
SA_pbp1-RV	CATCTTCTTTTCGTCCATCC
SA_pbp2-FW	ATAGAAATGTGAAGAGAACGA
SA_pbp2-RV	TAGTATTGTTATTTGATTGTGC
SA_pbp3-FW	AAATCGCACAAAGGCTCACA
SA_pbp3-RV	TACCCGTTTTTACCAGCAGT
SA_pbp4-FW	CATACGAACCGACGAGTG
SA_pbp4-RV	AATGATAGTGAATAATGGATGT
SA_gdpP-FW	CATCTATCGTTCTTGTCGT
SA_gdpP-RV	ATTGTGCTATCGCCTCTTC

Tab 1. Primer

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di Biologia Molecolare che viene utilizzata per amplificare frammenti specifici di genoma e creare copie multiple di DNA.

Inizialmente viene preparata una soluzione madre contenente:

-Buffer 5 µl;

-dNTPs 1 µl;

-Forward: 0,3 µl si lega all'estremità 5' del filamento positivo del DNA;

-Reverse: 0,3 µl si lega all'estremità 3' del filamento negativo del DNA;

(i due primers, Forward e Reverse, fungono da innesco per la polimerasi e vanno ad amplificare una determinata regione);

- Taq: 0,3 μ l la polimerasi del *Thermus Aquaticus*, perché è un enzima che resiste alle alte temperature;

- H₂O per arrivare al volume totale.

Queste quantità sono quelle necessarie per l'amplificazione di un singolo campione e vanno moltiplicate per il numero dei campioni in esame.

Successivamente si preleva 45 μ l di soluzione madre e viene messa in provette piccole da PCR con 5 μ l di DNA estratto di ogni rispettivo ceppo al fine di ottenere 50 μ l di volume per ogni campione. I campioni vengono inseriti a questo punto nel termociclatore, macchinario che in modo autonomo permette il cambiamento della temperatura nei tre passaggi della PCR. Viene impostata la temperatura, l'allungamento e il numero dei cicli che deve compiere.

La PCR consta di tre passaggi:

1. DENATURAZIONE: avviene ad una temperatura di 95°C che permette la separazione dei due filamenti;
2. ANNEALING: avviene ad una temperatura di 50-60°C in base alla temperatura di Melting calcolata dei due primers. In questa fase i due primers si legano ai loro siti specifici e fungono da innesco per la polimerasi;
3. ALLUNGAMENTO: avviene ad una temperatura di 70°C-75°C in base alla Polimerasi utilizzata, durante questa fase la polimerasi estende i primers aggiungendo le basi complementari al filamento stampo e il risultato sono due copie di DNA a doppio filamento.

Dal momento che entrambi i filamenti sono copiati durante la PCR, si ha un aumento di tipo esponenziale del numero di copie di DNA fino al raggiungimento di un plateau dovuto ad una riduzione dei reagenti disponibili per l'amplificazione, dove l'amplificazione dei filamenti non segue più una distribuzione esponenziale.

Le tre fasi vengono ripetute per 30-40 volte (cicli di amplificazione).

Terminati i cicli di amplificazione viene fatta l'Elettroforesi, ovvero si allestisce un gel di agarosio per la corsa del DNA.

Il gel viene inserito all'interno di una camera elettroforetica costituita in modo da consentire la separazione dei frammenti di DNA amplificati in base al loro peso molecolare.

Il DNA è carico negativamente e corre verso il polo positivo quindi dall'elettrodo Catodo (negativo) all'elettrodo Anodo (positivo).

6.5 Determinazione delle mutazioni a livello del gene *mecA*, *PBP1*, *PBP2*, *PBP3*, *PBP4* e *gdpP*

Sono stati sequenziati i genomi dei ceppi batterici presi in esame con il sequenziatore di Sanger presso la ditta Eurofins GmbH, Germania.

Il risultato del sequenziamento è un Elettroferogramma (Fig.6), cioè un grafico con dei picchi che corrispondono ognuno ad una base nucleotidica.

Viene fatta l'analisi delle sequenze utilizzando il programma bioinformatico BLAST e osservate poi le mutazioni confrontando la sequenza del ceppo in questione con quella del ceppo di riferimento Mu50 perché è un ceppo descritto in letteratura come *S. aureus* sensibile alla Ceftriaxone presente in banca dati.

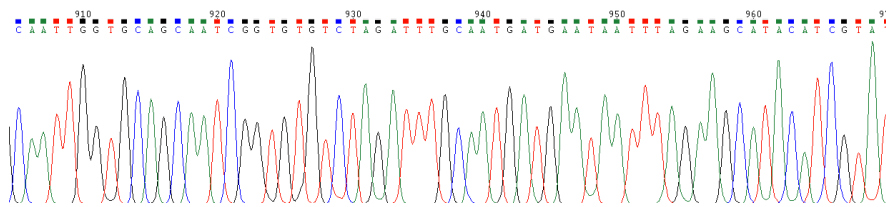


Fig.6 Elettroferogramma

6.6 Determinazione dei Sequence Type

I diversi Sequence Type dei ceppi MRSA risultati resistenti/ intermedi alla Ceftriaxone sono stati tipizzati mediante una tecnica l'MLST (multi locus sequence type). L'MLST è una tecnica di tipizzazione molecolare utilizzata per identificare l'evoluzione di popolazioni batteriche e individuare cloni batterici. La metodica utilizzata prevede una PCR di geni housekeeping, il loro successivo sequenziamento e l'attribuzione di un allele sulla base delle mutazioni puntiformi presenti nel gene. La somma degli alleli individuerà un profilo numerico che è associato ad un unico sequence type.

I geni sequenziati sono housekeeping cioè geni essenziali del microrganismo:

- *arc* (Carbamate kinase)
- *aro* (Shikimate dehydrogenase)
- *glp* (Glycerol kinase)
- *gmk* (Guanylate kinase)
- *pta* (Phosphate acetyltransferase)
- *tpi* (Triosephosphate isomerase)
- *yqi* (Acetyl coenzyme A acetyltransferase)

La metodica utilizzata è stata sviluppata da Mark Enright nel laboratorio di Brian Spratt, Imperial College di Londra, in collaborazione con i laboratori di Nick Day e Sharon Peacock. Tutte le informazioni tecniche sono disponibili alla pagina <https://pubmlst.org/saureus/>.

6.7 Spa Typing

Spa typing è una tecnica di tipizzazione più semplice rispetto all'MSLT, in quanto prevede il sequenziamento di un singolo locus genico. È stata sviluppata da Frenay et al e viene utilizzata per la sottotipizzazione dei ceppi di *S. aureus* ospedalieri.

Consiste nell'amplificazione tramite PCR della regione SSR del gene *spa* (che codifica per la proteina A), costituita da 24 bp ripetute che sono maggiormente soggette a delezioni e duplicazioni piuttosto che a mutazioni puntiformi. Il sequenziamento di questa regione mostra un profilo delle sequenze ripetute comune a ceppi appartenenti allo stesso cluster. Il riconoscimento del numero e del tipo di ripetizioni viene utilizzato per l'assegnazione di uno spa type.

Ad oggi in Europa il software che viene utilizzato per l'analisi delle sequenze *spa* è il Ridom StaphType (Ridom GmbH, Würzburg, Germania) e i risultati sono sincronizzati via Internet con il server <http://www.spaserver.ridom.de>, che è curato dall'iniziativa europea SeqNet.org (<http://www.seqnet.org>) in modo da garantire una nomenclatura universale.¹¹⁷

La reazione di amplificazione viene eseguita tramite la preparazione di una soluzione madre contenente:

- 0,5 µM del primer Forward;
- 0,5 µM del primer Reverse
- 2,5 U della Taq polimerasi Gold
- 2 mM MgCl₂;
- 350 µM di dNTPs
- 25 mM di KCl;

Viene aggiunto 1 µl del DNA diluito 1:200 e 24 µl di acqua ai 25 µl della soluzione madre di PCR nelle provette della PCR di 0,2 ml (Perkin-Elmer Divisione dei biosistemi applicati [PE-ABI]).

Inoltre si mettono anche due controlli:

- controllo negativo → acqua deionizzata sterile
- controllo positivo → *S. aureus* di cui si conosce la sequenza del gene *spa*.

Le varie provette della PCR vengono poi messe all'interno del termociclatore GeneAmp PCR System 9600 (PE-ABI), vengono impostate le condizioni: 10 minuti iniziali a 95 ° C, 30 cicli di 30 secondi a 95 ° C, 30 secondi a 60 ° C e 45 secondi a 72 ° C e un'estensione finale a 72 ° C per 10 min.

I prodotti PCR vengono poi purificati prima del sequenziamento che viene eseguito come precedentemente descritto.¹¹⁸

6.8 Caratterizzazione dei ceppi MRSA

La tipizzazione di *S. aureus* è stata eseguita utilizzando una tecnica molecolare chiamata Elettroforesi in campo pulsato dopo macro-restrizione (PFGE).

È una tecnica di fingerprinting molecolare che permette la caratterizzazione dei ceppi batterici e prevede la frammentazione enzimatica del genoma batterico, propedeutica alla separazione dei frammenti mediante corsa elettroforetica.

Una volta inglobato il ceppo batterico all'interno di un blocchetto di agarosio, poi vengono degradate parete e membrana batterica per estrarre il DNA. Successivamente il DNA viene poi digerito con enzimi di restrizioni che riconoscono siti di taglio poco comuni. In questo modo si ottengono macro-frammenti di DNA che separati tramite elettroforesi pulsata permettono la discriminazione dei ceppi e l'individuazione di clone epidemico (profilo genico identico).

Il procedimento di questa tecnica viene diviso in diversi giorni:

📅 Giorno 1:

viene preparata la sospensione batterica prelevando un quantitativo di ceppo (piastrato il giorno prima) elevata con un tampone e stemperato all'interno di una provetta da 15 mL contenente 5mL di fisiologica. Si azzerava l'assorbanza allo spettrofotometro con 1 mL di fisiologica sterile e si misura la torbidità di 1mL di sospensione batterica.

Viene poi applicata una formula:

$(\text{Densità ottica overnight} \times 4.7 \times 660/6) \times 0,01 \rightarrow \text{concentrazione in } \mu\text{g/mL}$

e

$$\frac{10 \mu\text{g di DNA}}{\text{Concentrazione } \mu\text{g/mL}}$$

Il valore finale che otteniamo è quello da prelevare e mettere all'interno di una provetta da 2 mL per avere 10 µg di DNA totali.

Inizialmente si fa una prima centrifugazione a 10000 RPM per 5 min, il ceppo si deposita tutto sul fondo della provetta, si elimina il sovrantante e si risospende con 1 mL di TEN. Si fa una seconda centrifugazione sempre 10000 RMP per 5 min, si elimina il sovrantante e poi si risospende con 500 µl di TEN.

A questo punto si realizzano i blocchetti di agarosio (plug) all'interno dei quali viene inglobato ogni ceppo.

Si prepara una soluzione di agarosio Low-melting (solidifica alla temperatura di 37°C) all' 1,6%, 500 µl di agarosio appena preparato e non ancora solidificato vengono mescolato con i 500 µl di sospensione batterica.

Tramite pipetta si prelevano 100 µl di preparato che vengono inseriti in uno stampo (plug mold). Per ogni ceppo batterico di preparano circa 10 blocchetti che vengono lasciati solidificare.

Nel frattempo si prepara una provetta per ogni ceppo che contiene 2 ml di lysis buffer (soluzione di sali che facilita la rottura della parete batterica), il lisozima (enzima che degrada il peptidoglicano, 1 mg/mL) e l'RNasi (50 µg/mL). Le plug una volta solidificate, vengono immerse nella soluzione di lisi e incubate per 24 ore a 37°C.

Il contenuto di questa provetta viene suddiviso in delle provette nuove da 15 ml in una quantità di 2 mL per ogni ceppo, insieme alle plug solidificate e poi si mettono nel termostato a 37°C.

Giorno 2

Si elimina tutto il lysis buffer di ciascuna provetta e si sostituisce con 2 ml di digestion buffer contenente 0,5 mg/mL di Proteinasi-k. Questa soluzione inattiva tutte le proteine presenti all'interno del ceppo batterico. A questo punto si posiziona il tutto nel termostato a 55°C per 24 ore.

Giorno 3

Affinché venga eliminato tutto il digestion buffer (che può interferire con la digestione del DNA ad opera degli enzimi di restrizione), vengono eseguiti dei lavaggi delle plug con 5 mL di TE in agitazione per 15 min. Questo passaggio è stato ripetuto per 3 volte, sostituendo di volta in volta il TE.

Dopo i vari lavaggi si prende mezza plug di ogni ceppo e si mette all'interno di una provetta da 2 mL e si aggiunge l'enzima di restrizione Sma I in una concentrazione di 30U. L'enzima per reagire ha bisogno di un Buffer concentrato 10X, che contiene sali e condizioni di pH ottimali per l'attività dell'enzima. La digestione viene eseguita a 30°C per 18 ore, in modo da permettere un taglio ottimale dei frammenti.

Giorno 4

L'attività enzimatica di SmaI viene bloccata con 500 µl di EDTA che funge da chelante per gli ioni. A parte si prepara il gel d'agarosio in TBE 0.5X all'interno del quale si fissano le plug per la successiva corsa. Una volta che il gel d'agarosio contenente le plug si solidifica, esso viene inserito all'interno dell'apparato per l'elettroforesi in campo pulsato CHEF MAPPER II. La corsa elettroforetica viene eseguita in tampone TBE 0.5X, con una temperatura costante di 14°C. I parametri utilizzati per la

separazione delle bande di DNA sono switch iniziale 1s, switch finale 30s, campo elettrico 6,0 V/cm², ramping factor lineare.

La migrazione del campo elettrico cambia di continuo e la separazione dei frammenti viene ottenuta sfruttando la lentezza dei frammenti più grandi nel riorientarsi al nuovo campo elettrico.

Per la lettura dei risultati il gel viene immerso in una soluzione di bromuro d'etidio di 0,5 mg/L per 30 minuti. Il bromuro d'etidio è un intercalante del DNA che se eccitato tramite radiazione ultravioletta emette un segnale luminoso. Tramite un transilluminatore è possibile individuare pattern di migrazione del DNA appartenente ad un ceppo batterico che è specifico per ogni isolato. Nell'analisi successiva si vanno a confrontare i frammenti di DNA dei diversi ceppi che hanno migrato per vedere se ci sono delle correlazioni. La definizione dei criteri di correlazione è stata stabilita da Tenover et al.¹¹⁹

Se fra due isolati non c'è nessuna differenza in termini di bande essi possono essere considerati come identici.

Se ha 2-3 frammenti di differenza → "strettamente correlato"

Se ha 4-6 frammenti di differenza → "probabilmente correlato"

Se possiede più di 7 frammenti di differenza → "non correlato"

7. RISULTATI

Sono stati analizzati mediante Antibiogramma un totale di 239 ceppi di MRSA ospedalieri nei confronti della Ceftarolina (CPT), una nuova Cefalosporina di quinta generazione.

A seconda del metodo utilizzato per la determinazione della sensibilità i risultati sono stati differenti.

Quando analizzati con metodo EUCAST, dei 239 ceppi saggiati, 186 isolati risultavano sensibili, 41 intermedi e 12 resistenti. Nel caso dell'utilizzo della metodica CLSI invece, 228 ceppi risultavano sensibili alla CPT, 10 intermedi e solamente 1 resistente.

In 54 ceppi si è osservato un diverso valore dell'alone di inibizione se l'antibiogramma veniva effettuato con il dischetto da 5 µg/mL (CLSI) o da 30 µg/mL (EUCAST). (Tab.2)

Risposta dei ceppi alla CPT	N° CTP 5µg/mL	N° CPT 30µg/mL
Sensibili	186	228
Intermedi	41	10
Resistenti	12	1

Tab. 2 Ceppi CPT-Resistenti, CPT-sensibili, CPT-intermedi con entrambe le metodiche (EUCAST,CLSI).

Infatti sul totale dei ceppi un 5,02% ha mostrato resistenza con la metodica europea (EUCAST) e lo 0,41% con la metodica americana (CLSI). (Fig.7 e Fig.8)

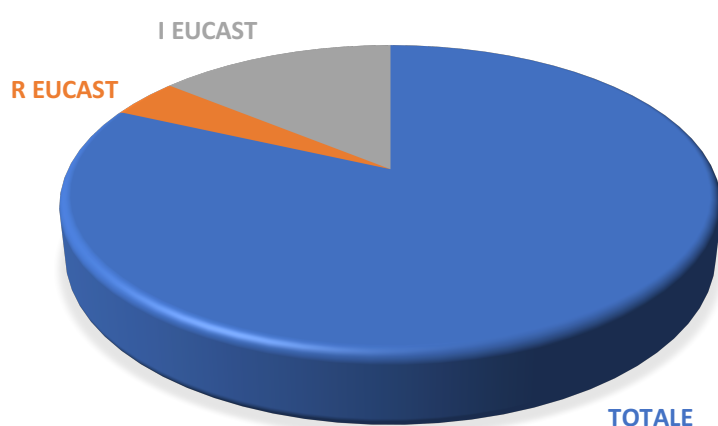


Fig.7 Ceppi Resistenti e Intermedi sul totale dei ceppi con metodica EUCAST

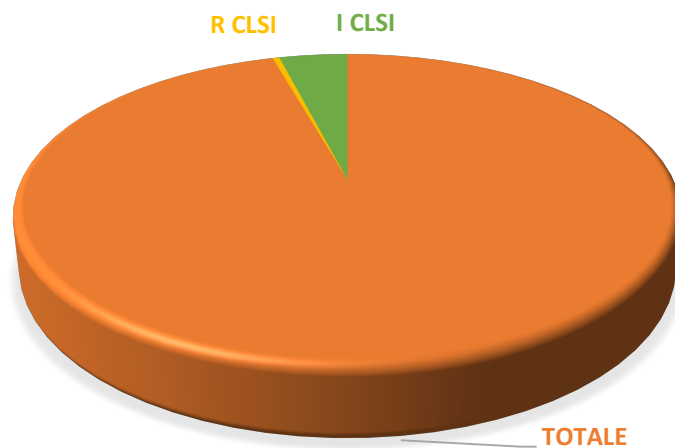


Fig.8 Ceppi Resistenti e Intermedi sul totale dei ceppi con metodica CLSI

I ceppi risultati intermedi e resistenti con la metodica EUCAST, sono stati ulteriormente saggiati tramite E-test per confermare l'effettiva presenza di un fenotipo non-suscettibile. Dei 53 ceppi selezionati dal primo screening solamente 15 sono risultati non suscettibili alla Ceftarolina tramite conferma con l'E-test. La conferma dei saggi di MIC alla ceftarolina mediante E-test ha modificato le percentuali di non suscettibilità a questo farmaco: sulla base di questi risultati infatti la percentuale di ceppi non suscettibili alla ceftarolina è del 6,28%. I ceppi che risultano effettivamente resistenti alla ceftarolina (MIC >2 mg/L) sono 6 (2,51%).

Questi isolati sono stati poi tipizzati attraverso Smal-PFGE, MLST, spa-typing e i meccanismi di resistenza sono stati caratterizzati tramite l'amplificazione, il sequenziamento e l'analisi delle sequenze dei geni codificanti le penicillin-binding proteins (*mecA*, *pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *pbp4*) e la Cyclic-di-AMP phosphodiesterase (*gdpP*) come mostrato nella tabella 3.

MRSA non-suscettibili al CPT	MIC	Sequenze aminoacidiche						
		MecA	Pbp1	Pbp2	Pbp3	Pbp4	GdpP	
348839	2	N146K	WT	C197Y	T92X	WT	WT	
350355	3	N146K	WT	WT	WT	WT	S606A	
350990	1,5	S225R	S629T	C197Y - L256V - P285A - T439V	R504K - K584F	D98E - S189T - E398A	S391P	
351138	3	N146K	WT	C197Y	T92X	WT	WT	
352867	2	N146K	WT	C197Y	T92X	WT	WT	
361128	3	N146K	S194N	C197Y	WT	N337D	WT	
365325	3	N146K	S194N	C197Y	WT	N337D	WT	
366780	2	N146K	WT	C197Y	WT	L354X	Q572R	
415469	4	N146K	WT	WT	WT	WT	WT	
422253	1,5	N146K	WT	WT	WT	WT	S606A	
423591	3	N146K	WT	WT	WT	WT	WT	
565915	1,5	WT	S629T	C197Y - L246T - P285A - T439V - T691A	R504K - K584N	D98E - S189T	N105D – S391P	
6441	2	N146K	WT	WT	WT	WT	S606A	
9251	1,5	N146K	WT	WT	WT	WT	S606A	

Tab.3 Caratterizzazione degli isolati e delle mutazioni a livello della PBPs

7.1 Mutazioni puntiformi a livello della PBP2a

12 ceppi hanno la mutazione N146K; 1 ceppo ha la mutazione S225R; 1 ceppo solo ha presentato il la proteina MecA Wild-Type (WT).

7.2 Mutazioni puntiformi a livello delle PBPs

- A livello della **Pbp1**: quattro ceppi hanno presentato mutazione in particolar modo il 350990 e il 565915 la S629T, e il 361128 e il 365325 la mutazione S194N, i restanti ceppi sono risultati WT;
- a livello della **Pbp2**: otto hanno presentato la mutazione C197Y (anche se in due ceppi sono state rilevate altre mutazioni, ovvero nel ceppo 350990 sono presenti anche la L256V, P285A, T439V e nel ceppo 565915 sono presenti le mutazioni L246T, P285A, T439V, T691A), sei ceppi invece sono risultati WT;
- a livello della **Pbp3**: tre ceppi hanno presentato la mutazione T92X, due ceppi le mutazioni R504K e K584N, mentre 9 ceppi hanno mostrato il fenotipo WT;
- a livello della **Pbp4**: due ceppi sono caratterizzati da più mutazioni, ovvero il ceppo 350990 presenta le mutazioni D98E, S189T, E398A e il ceppo 565915 le mutazioni D98E e S189T, 2 ceppi hanno la mutazione N337D, un solo ceppo la mutazione L354X e 7 sono risultati WT per questa pbp.

7.3 Mutazioni a livello della GdpP

Nel ceppo 565915 sono state riscontrate due mutazioni, N105D e S391P, mentre nel ceppo 366780 è presente la mutazione Q572R. Sette ceppi invece hanno il fenotipo WT.

I ceppi 350355, 422253, 6441 e 9251 hanno la stessa mutazione S606A nonostante gli ultimi due sono stati isolati nell'Ospedale E. profili di Fabriano.

Nel ceppo 350990 è stato possibile solo individuare la mutazione S391P.

7.4 Epidemiologia degli MRSA CPT-non suscettibili

Dall'analisi tramite PFGE di questi 15 ceppi il 348839, il 351138 e il 352867 mostrano lo stesso pattern di Smal-PFGE, così come il 350355, il 422253, il 6441 e il 9251 sono strettamente correlati tra loro, mentre gli altri possiedono differenti pulsotipi (*Tab. 4 e Fig.9*). Inoltre si è potuto osservare che i due ceppi 6441 e 9251, isolati da pazienti ricoverati nell'Ospedale E. Profili di Fabriano, presentano lo stesso pulsotipo del 350355, 422253 isolati nell'Ospedale Riuniti di Ancona.

I ceppi risultati resistenti appartengono a due Sequence type ST228 e ST22. Considerando invece l'epidemiologia tramite spa-typing, tutti i ceppi appartenenti al ST228 appartenevano allo spa-type t041. I due ceppi ST22 invece mostravano spa-type differenti, il ceppo 350990 allo spa-type t18014 mentre il ceppo 565915 ad un nuovo spa-type in corso di assegnazione da parte della banca dati.

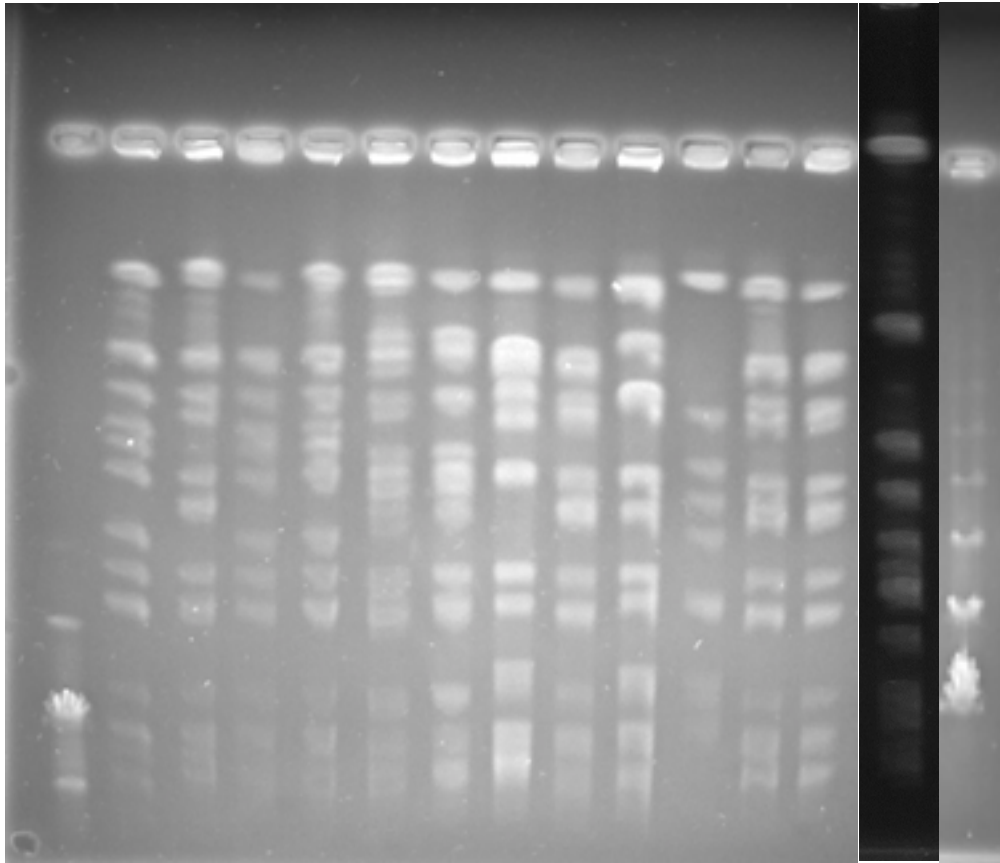
L'ST22 ha mostrato un valore di MIC di 1,5 R/I nei confronti della Ceftarolina a causa delle molteplici mutazioni a livello delle PBPs e nella GdpP, pur non presentando una proteina MecA mutata.

Gli isolati ST228 mostrano tutti la sostituzione N146K a livello della PBP2a.

Il ceppo 415469 ha mostrato il valore di MIC più elevato pur avendo le PBPs wild-type ad eccezione della PBP2a nella quale troviamo la mutazione N146K. Questa mutazione è stata riscontrata in tutti i ceppi con MIC maggiore o uguale a 2 µg/ml.

MRSA strain	Pulsotipo	SPA-Type	MLST							
				arc	aro	glp	gmk	pta	tpi	yql
348839	A	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
350355	B	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
350990	C	t18014	ST22	7	6	1	5	8	8	6
351138	A	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
352867	A	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
361128	D	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
365325	D	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
366780	E	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
415469	F	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
422253	B	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
423591	F	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
565915	G	New	ST22	7	6	1	5	8	8	6
6441	B	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29
9251	B	t041	ST228	1	4	1	4	12	24	29

Tab.4 Profilo genico degli MRSA CPT-non suscettibili



L	3	3	3	3	3	3	3	4	4	5	6	9	3	λ
O	4	5	5	5	6	6	6	2	2	6	4	2	5	
W	8	0	1	2	1	5	6	2	3	5	4	5	0	
	8	3	1	8	1	3	7	2	5	9	1	1	9	
	3	5	3	6	2	2	8	5	9	1			9	
	9	5	8	7	8	5	0	3	1	5			0	

Fig.9 Corsa elettroforetica

8. DISCUSSIONE

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza ha reso non utilizzabili a livello clinico molte classi di antibiotici. La commercializzazione di nuovi antibiotici rappresenta per la cura delle infezioni batteriche un evento fondamentale per poter superare il problema dell'antibiotico resistenza. Non sempre però, l'introduzione di nuove molecole va di pari passo con l'efficacia clinica.

In particolare in questo studio i ceppi di MRSA saggiati hanno mostrato fenomeni di resistenza agli antibiotici β -lattamici compresi quelli sviluppati in tempi recenti come il Ceftobiprololo e la Ceftarolina.

È stata riscontrata una elevata differenza di suscettibilità alla Ceftarolina utilizzando le due diverse metodiche CLSI e EUCAST. Infatti i ceppi risultati sensibili con la metodica CLSI sono 186 rispetto ai 228 con la metodica EUCAST, i resistenti sono 12 con CLSI e 1 solo ceppo con EUCAST e infine gli intermedi sono 41 utilizzando il dischetto CLSI e 10 con il dischetto EUCAST. La percentuale di resistenza rilevata è quindi diversa, con il 5,02% di ceppi resistenti con la metodica Europea e uno 0,41% con la metodica americana.

Questi risultati dimostrano le differenze fra i due standard: il metodo CLSI risulta più permissivo e rileva una minore percentuale di popolazione resistente, suggerendo una classificazione dei ceppi più rilassata.

Il successivo test tramite dischetto di antibiotico (E-test) ha permesso di chiarire l'effettiva prevalenza dei ceppi non suscettibili alla ceftarolina ($MIC > 1\text{mg/L}$), 15 su un totale di 239 ceppi. La percentuale di non suscettibilità nel nostro ospedale è del 6,27%, un valore in linea con le precedenti sorveglianze dove era stata riscontrata una percentuale di ceppi non suscettibili alla ceftarolina in Europa compresa tra il 7 e il 9,1%.^{120,121}

Considerando invece la caratterizzazione dei ceppi, nel nostro studio sono stati rilevati due differenti ST, ST228 e ST22. Entrambi i ST fanno parte di cloni adattati all'ambiente ospedaliero e sono stati individuati negli ospedali italiani da molti anni.¹²²

Tutti i ceppi appartenenti al ST228 presentavano la mutazione N146K a livello della PBP2a, già descritta in altri lavori in letteratura. Ad esempio, Andrey D. O. ha evidenziato che in 76 ceppi su 96 l'alone di inibizione ha un diametro ≥ 20 mm, mentre 20/96 hanno un diametro < 20 mm e in particolar modo un ceppo con $MIC=2\mu\text{g/ml}$ aveva il sequence type ST228 e anche la mutazione N146K a livello della PBP2a.

La maggior parte dei ceppi resistenti alla Ceftarolina presentano la mutazione N146K nel dominio allosterico PBP2a. Questa insieme all'E150K e all'E239K, descritte in letteratura, sono le mutazioni

più frequenti riscontrate nei ceppi con un valore di MIC pari a 2 µg/ml, isolati non solo in Italia ma anche in Ungheria, Russia, Spagna e Turchia. L'autore inoltre ha evidenziato la presenza di altre mutazioni come *clpX*, *stp1* e *prsA* e mutazioni a livello del promotore di *pbp4* le quali sembrano essere associate alla resistenza alla ceftarolina, mentre il basso livello di resistenza è associato a mutazioni a livello della PBP2 in entrambi i domini, allosterico (N146K, E150K, N204K, E239K, G246E) o traspeptidasico (H351N, Y446N, E447).¹²³

Sono state descritte da Lee H. anche altre mutazioni negli MRSA a livello della PBP2a: N104K, V117I, E447K, I563T e S649A negli isolati ST5-t111, A228V e I563T negli isolati ST5-t17573, L357I in ST5-t964 e T564 e N104K e V117I in ST5-t601. In particolar modo le sostituzioni a livello dell'nPBD, N104K-V117I in ST5-t601 e N146K in ST5-t002, hanno ridotto la sensibilità alla Ceftarolina portando il valore della MIC da 1 a 2 mg / L.¹²⁴

È stato osservato anche da Bongiorno et al. che la resistenza alla Ceftarolina nell'isolato ST239-SCCmecIII-t037 era dovuta a mutazioni a livello della PBP2a in posizioni diverse da quelle rilevate nel Sequence type ST228 (N204K; T235I). In questo ceppo, anche la sostituzione T235I, la quale è stata riportata per la prima volta in Italia, è presente nel nPBD a conferma che questa regione è un "punto caldo" delle mutazioni.¹²⁵

In questo lavoro è emerso che le MIC più elevate sono presenti nei ceppi con una mutazione a livello della PBP2a e Sequence type ST228, osservato già da Kelly W. L. da una raccolta di ceppi MRSA ospedalieri dal 1998 al 2003, nei quali è emerso che la riduzione della sensibilità nei confronti della Ceftarolina (MIC > 1µg/ml) è correlata a quel sequence type (che insieme al ST22 fa parte del sequence type ospedaliero) e a mutazioni presenti a livello della PBP2a, non solo la N146K ma anche la E150K, N204K, E239K, G246E, H351N, E447K indipendentemente dal luogo in cui sono stati isolati.¹²⁶

Nel nostro caso l'unica mutazione differente da N146K è stata riscontrata in un ceppo ST22 (350990) ed è la mutazione S225R. Questa mutazione è già stata descritta in ceppi africani con ST differenti che mostravano resistenza a ceftarolina e ceftobipolo.¹²⁷

Come descritto da Schaumburg, anche nel nostro caso alcuni degli MRSA che sono stati risultati non suscettibili alla Ceftarolina, erano già risultati resistenti al Ceftobipolo, in particolare il 35099, il 351138, il 365325, il 366780, il 415469 e il 422253.¹¹¹

La maggior parte degli isolati che presentavano entrambe le resistenze possedevano la mutazione N146K. D'altra parte bisogna invece notare che i meccanismi di resistenza per il Ceftobipolo sono risultati essere più variegati, con un numero maggiore di mutazioni riscontrate rispetto a quelle

presenti nei ceppi resistenti alla Ceftriaxone. In questo caso i meccanismi di resistenza sono più conservati e associati a mutazioni a livello principalmente della PBP2a (N146K) e meno a livello delle PBPs e *gdpP*. Si potrebbe ipotizzare che la mutazione N146K risulta maggiormente critica nello sviluppo di resistenza alla ceftriaxone, mentre per il ceftazidime esistono altri aminoacidi target la cui modifica influisce sull'attività dell'antibiotico. Allo stesso modo, mentre i ceppi resistenti al ceftazidime appartengono a ST diversi, i ceppi non suscettibili alla ceftriaxone individuati fanno parte solamente di due ST, ST228 e ST22.

Le mutazioni a livello del *gdpP* risultano meno critiche per la tolleranza alla ceftriaxone: un recente lavoro pubblicato da un gruppo italiano¹²⁵ ha infatti evidenziato ceppi resistenti alla ceftriaxone appartenenti al ST228 con mutazione N146K a livello della PBP2a. Le MIC di questi ceppi risultavano identiche a quelle trovate per i ceppi ST228 con mutazione N146K di questo studio, ma mostrano mutazioni a livello della *gdpP* che sono ugualmente presenti in ceppi che risultano sensibili alla ceftriaxone. Queste mutazioni sembrano quindi non avere effetto sulla MIC alle cefalosporine di ultima generazione.

In letteratura vengono descritti ceppi di *S.aureus* modificati attraverso diversi passaggi in vitro e poi testati con la Ceftriaxone e si è visto che presentano mutazioni alcune delle quali sono state riscontrate in ceppi isolati in ospedale e non modificati in vitro.¹¹²

Da un esperimento in vitro di Gostev le mutazioni sono state rilevate principalmente dopo 20-40 passaggi e tuttavia i ceppi derivati di ST8 e ST239 erano già in grado di crescere ad un'alta concentrazione di Ceftriaxone dopo solo 5 passaggi.¹²⁸

9. CONCLUSIONI

Questo studio ha rilevato la presenza di ceppi MRSA non suscettibili nei confronti dell'antibiotico Ceftarolina sviluppato in tempi recenti. Tale resistenza è dovuta essenzialmente a sostituzioni aminoacidiche a livello delle PBPs (pbp1, pbp2, pbp3, pbp4) e della gdpP.

Lo studio è stato condotto su ceppi MRSA nosocomiali italiani ed è pertanto da verificare la presenza di ceppi resistenti alla Ceftarolina anche a livello comunitario.

La sensibilità e la resistenza degli MRSA alla Ceftarolina è stata valutata mediante antibiogramma (Kirby-Bauer), metodo qualitativo che ha dato risultati variabili, pertanto è opportuno ritestare i vari ceppi utilizzando la Ceftarolina in polvere e la microdiluizione in brodo (MIC) per avere un valore più preciso (quantitativo) della concentrazione di inibizione dell'antibiotico nei confronti degli MRSA.

BIBLIOGRAFIA

1. Lakhundi S., Zhang K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology.
2. Gould D., Chamberlaine A. (1995). *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. JCN
3. Kock R. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe.
4. Tong Y. C. S., Davis S. J. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management.
5. La Placa M. (1971). Stafilococchi, pag. 208-216; I farmaci antibatterici, pag. 178, in *Principi di microbiologia medica* Bologna: Società editrice Esculapio; 2008.
6. Murray P. R. (Ottava edizione). *Microbiologia medica*. Società editrice Elsevier.
7. Antonelli G. *Principi di microbiologia medica*.
8. Otto M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxin.
9. Berube BJ, Bubeck W. J. (2013). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue.
10. Inoshima I., Inochima M. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med*
11. Tam K., Torres J. V (2018). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes.
12. Kanedo J., Kimura T. (1997). Panton-Valentine leucocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775).
13. Boakes E., Kearns AM. (2011). Distinct bacteriophages encoding Panton-Valentine leukocidin (PLV) among international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones harboring PLV. *J Clin Microbiol*.
14. Spaan AN., Henry T. (2013). The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe*.
15. Spaan AN., Henry T. (2015) Differential Interaction of the staphylococcal toxins Panton-Valentine leukocidin and γ -hemolysin CB with human C5a receptors.
16. Gravet A., Colin D.A. (1998). Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family.
17. DuMont A.L., Yoong P. (2014). Identification of a crucial residue required for *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxicity and receptor recognition. *Infect. Immun*.
18. DuMont A.L., Yoong P. (2013). *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin.

19. McCarthy AJ, Lindsay JA. (2013). Staphylococcus aureus innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatic study. *Infect Genet Evol.*
20. Von Eiff C., Friedrich AW. (2004). Prevalence of gene encoding form members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Diagn Microbiol Infect Dis.*
21. Cooney J., Kienle Z. (1993). The gamma-hemolysin locus of Staphylococcus aureus comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leucocidin. *Infect Immun.*
22. Spaan AN., Reyes-Robles T. (2015). Staphylococcus aureus targets the Daffy antigen receptor for chemokines (DARC) to lyse erythrocytes. *Cell Host Microbe.*
23. Spaan AN, Vrieling M. (2014). The Staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors.
24. Wang R, Braughton K.R. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA.
25. Kretschmer D., Gleske A.K. (2010). Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic Staphylococcus aureus. *Cell Host Microbe.*
26. Novick R.P., Schlievert P. (2001). Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.*
27. Rooijackers S.H., van Wamel W.j. (2005). Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.*
28. Hammel M., Sfyroera G. (2007). A structural basis for complement inhibition by Staphylococcus aureus. *Nat Immunol.*
29. Jongerius I., Kohl J. (2007). Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J. Exp. Med.*
30. Rabijns A., De Bondt H.L. (1997). Three-dimensional structure of staphylokinase, a plasminogen activator with therapeutic potential. *Nat. Struct. Biol.*
31. Schlott B., Guhrs K.H. (1997). Staphylokinase requires NH₂-terminal proteolysis for plasminogen activation. *J. Biol. Chem.*
32. Gase A., Hartmann M. (1996). Functional significance of NH₂- and COOH- terminal regions of staphylokinase in plasminogen activation. *Thromb Haemost.*
33. Lijnen H.R., Van Hoef B. (1991). On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. *J. Biol. Chem.*

34. Rooijackers S.H., van Wamel W.J. (2005). Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.*
35. Jin T., Bokarewa M. (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol.*
36. Braff M.H., Jones A.L. (2007). *Staphylococcus aureus* exploits cathelicidin antimicrobial peptides produced during early pneumonia to promote staphylokinase-dependent fibrinolysis. *J Infect Dis.*
37. Kwiecinski J, Peetermans M. (2016) Staphylokinase control of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and detachment through host plasminogen activation. *J. Infect Dis.*
38. kwiecinski J., Jacobsson G. (2013). Staphylokinase promotes the establishment of *Staphylococcus aureus* skin infections while decreasing disease severity. *J. Infect Dis.*
39. Cunningham L., Catlin B.W. (1956). A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes* 1. *J Am Chem*
40. Cuatrecasas P., Fuchs S. (1967). Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol Chem.*
41. Davis A., Moore I.B. (1977). Nuclease B. A possible precursor of nuclease A, an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*.
42. Kiedrowski M.R., Kavanaugh J.S. (2011). Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
43. Banbula A., Potempa J. (1998). Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the *Staphylococcus aureus* metalloproteinase at 1.72 Å resolution.
44. Bjoorklind A., Jornvall H. (1974). Substrate specificity of three different extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*.
45. Drapeau G.R. (1978). Role of metalloprotease in activation of the precursor of Staphylococcal protease. *J. Bacteriol.*
46. Arvidson S. (1973). Studies on extracellular proteolytic enzyme from *Staphylococcus aureus* II. Isolation and characterization of an EDTA sensitive protease.
47. Sieprawska-Lupa M., Mydel P. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother.*
48. Laarman A.J., Ruyken M. (2011). *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol.*

49. Rice K., Peralta R. (2001). Description of *Staphylococcus* serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect Immun*.
50. Drapeau G.R., Boily Y. (1972). Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*.
51. Potempa J., Watorek W. (1986). The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*
52. Prokesova L., Potuznikova B. (1992). Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol Lett*
53. Rousseaux J., Rousseaux-prevost R. (1983). Proteolysis of rat IgG subclasses by *Staphylococcus aureus* V8 proteinase. *Biochim Biophys*
54. Rzychon M., Sabat A. (2003). Staphostatins: an expanding new group of proteinase inhibitors with a unique specificity for the regulation of staphopains, *Staphylococcus* spp. Cysteine proteinases.
55. Loughran A.L., Atwood D.N. (2014). Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic sarA mutants. *Microbiologyopen*
56. Mootz J. M, Malone C.L (2013) Staphopains modulate *Staphylococcus aureus* biofilm integrity. *Infect Immun*
57. Laurent TC, Fraser JR. 1992. Hyaluronan.
58. Monslow J, Govindaraju P. (2015). Hyaluronan: a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Front Immunol*
59. Lee-Sayer S.S., Dong Y. (2015). The where, when, how, and why of hyaluronan binding by immune cells. *Front Immunol*
60. Hynes W.L., Walton S.L. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*
61. Hart M.E., Hart M.J. (2009). Genotypic and phenotypic assessment of hyaluronidase among type strains of a select group of staphylococcal species. *Int J Microbiol*
62. Devriese L.A., Hajek V. (1978). *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb nov and *Staphylococcus hyicus* subsp chromogenes subsp nov. *Int J Syst Bacteriol*
63. Duran-Reynals F. (1933). Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J Exp Med*
64. Chain E., Duthie E.S. (1940). Identity of hyaluronidase and spreading factor. *Br J Exp Pathol*

65. Doery H.M., Magnusson B.J. (1965). The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *J Gen Microbiol*
66. Magnusson B.J., Gulasekharan J. (1962). Phospholipase activity of staphylococcal toxin. *Nature*
67. Daugherty S., Low M.G. (1993). Cloning, expression, and mutagenesis of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Staphylococcus aureus*: a potential staphylococcal virulence factor. *Infect Immun*
68. Goldstein R., Cheng J. (2012). Structure of the *S. aureus* PI-specific phospholipase C reveals modulation of active site access by a titratable π -cation latched loop. *Biochemistry*
69. Griffith OH, Ryan M. (1999). Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim Biophys Acta*
70. Heinz D.W., Essen L.O. (1998). Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C. *J Mol Biol*
71. 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
72. Annunziato L., Renzo D. G. Trattato di farmacologia: Società editrice Idelson-Gnocchi.
73. Kiang T.K., Wilby K.J. (2015). A critical review on the clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical trials of ceftaroline. *Clin Pharmacokinet*
74. Jandourek A., Smith A. (2014). Efficacy of ceftaroline fosamil for bacteremia associated with community-acquired bacterial pneumonia. *Hosp Pract*
75. Juwon Y., Leah M. (2017). Use of ceftaroline fosamil in children: review of current knowledge and its application. *Infect Dis Ther*
76. Ishikawa T., Matsunaga N. (2003). TAK-599, a novel N-phosphono type prodrug of anti-MRSA cephalosporin T-91825: synthesis, physicochemical and pharmacological properties.
77. Zhanel G. G., Sniezek G. (2009). Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
78. Laudano J.B. (2011). Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin.
79. Barbour A., Schmidt S. (2008). Ceftobiprole: a novel cephalosporin with activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).
80. Morosini M.I., Diez-Aguilar M. Mechanisms of action and antimicrobial activity of ceftobiprole.
81. European Commission, (2011). COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL PARLAMENTO

EUROPEO E AL CONSIGLIO, Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR) /* COM/2011/0748.

82. Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*
83. Fuda S. C. C., Fisher F. J. (2005). β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*
84. Gandolfi F. Determinazione delle caratteristiche fenotipiche e genotipiche di ceppi di *Staphylococcus* in relazione a meticillino- e vancomicino-resistenza.
85. Rountree P.M., Beard M.A. (1968). Hospital strains of *Staphylococcus aureus*, with particular reference to methicillin-resistant strains. *Med J*
86. Givney R., Vickery A. (1998). Evolution of an endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* population in an Australian hospital from 1967 to 1996. *J Clin Microbiol*
87. Torvaldsen S, Roberts C, Riley TV. 1999. The continuing evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Infect Control Hosp Epidemiol*
88. Barrett F.F., McGehee R.F. (1968). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *N Engl J Med*
89. Panlilio A.L., Culver D.H. (1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol*
90. National Nosocomial Infections Surveillance System. (2003). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am J Infect Control*
91. Ito T., Iijima M. (2008). Pediatric pneumonia death caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Japan. *Emerg Infect Dis*
92. Hiramatsu K., Cui L. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*
93. Lina G., Durand G. (2006). Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis.
94. Ito T, Hiramatsu K. 1998. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*
95. Shore A.C., Deasy E.C. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*

96. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*
97. Katayama Y., Ito T. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*
98. Carroll D., Kehoe M.A. (1995). Novel organization of the site-specific integration and excision recombination functions of the *Staphylococcus aureus* serotype F virulence-converting phages phi 13 and phi 42. *Mol Microbiol*
99. Wang L., Archer G.L. (2010). Roles of CcrA and CcrB in excision and integration of staphylococcal cassette chromosome *mec*, a *Staphylococcus aureus* genomic island. *J Bacteriol*
100. Sader H. S., Rhomberg P.R. (2018). Evaluation of the Revised Ceftaroline Disk Diffusion Breakpoints When Testing a Challenge Collection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates)
101. Ito T., Katayama Y. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*
102. Ito T., Ma X.X. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*
103. O'Brien F.G., Pearman J.W. (1999). Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J Clin Microbiol*
104. Oliveira D.C., Tomasz A. (2001). The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist*
105. Sa-Leao R., Santos Sanches I. (1999). Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol*
106. Oliveira D.C., Milheirico C. (2006). Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob Agents Chemother*
107. Berglund C., Ito T. (2008). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents*

Chemother

108. Garcia-Alvarez L., Holden M.T. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*
109. Long S.W., Olsen J. R. (2014). PBP2a mutations causing high level Ceftaroline Resistance in Clinical Methicillin-Resistant *S. aureus* isolated.
110. Chan C. Liana, PBP 4 Mediates High-Level Resistance to New-Generation Cephalosporins in *Staphylococcus aureus*
111. Morroni G., Brenciani A. (2018). High Rate of Ceftobiprole Resistance among Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Hospital in Central Italy
112. Hamilton S.M., Alexander J.A.N (2017). High-Level Resistance of *Staphylococcus aureus* to β -Lactam Antibiotics Mediated by Penicillin-Binding Protein 4 (PBP4).
113. Levine P. Donald. Vancomycin: History.
114. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019
115. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
116. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
117. Deurenberg R. H. (2006) The molecular evolution of MRSA
118. Shopsin B. (1997) Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains.
119. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*.
120. Bae I.G., Stone G.G. (2019) Activity of ceftaroline against pathogens associated with community-acquired pneumonia collected as part of the AWARE surveillance program, 2015-2016. *Diagn Microbiol Infect Dis*.
121. Sader H.S., Flamm R.K. (2018). Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents tested against organisms isolated from patients with community-acquired bacterial pneumonia in Europe, Asia, and Latin America. *Int J Infect Dis*.

122. Campanile F, Bongiorno D. (2009). Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*.
123. Andrey D. O., Francois P. (2016). Antimicrobial activity of ceftaroline against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates collected in 2013–2014 at the Geneva University Hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*
124. Lee H., Yoon E.-J. (2018). Ceftaroline Resistance by Clone-Specific Polymorphism in Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *American Society for Microbiology*
125. Bongiorno D., Mongelli G. (2019). Genotypic analysis of Italian MRSA strains exhibiting low-level ceftaroline and ceftobiprole resistance. Elsevier.
126. Kelley W. L., Jousselin A. (2015). Missense Mutations in PBP2A affecting Ceftaroline Susceptibility Detected in Epidemic Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland Archived since 1998.
127. Schaumburg F., Peters G. (2016). Missense mutations of PBP2a are associated with reduced susceptibility to ceftaroline and ceftobiprole in African MRSA. *J Antimicrob Chemother*.
128. Gostev V., Sopova J. (2019). In Vitro Ceftaroline Resistance Selection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involves Different Genetic Pathways.

