



Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

PATOGENICITA' DEGLI ENTEROCOCCHI ***PATHOGENICITY OF ENTEROCOCCI***

Tesi di Laurea
Benedetta Nicoletta Mariani

Docente Referente
Prof.ssa Carla Vignaroli

Sessione Estiva
2019/2020

RIASSUNTO:

Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. 2019 Pathogenicity of Enterococci. Microbiol Spectrum 7(4):GPP3-0053-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018

Gli enterococchi sono caratterizzati dalla capacità di adattarsi e sopravvivere in una varietà di ambienti sfavorevoli, comprese superfici inanimate in ambiente ospedaliero. Tale capacità intrinseca ha consentito loro di interagire con molti microrganismi e di acquisire geni di resistenza agli antibiotici presenti su elementi genetici mobili; il rapido incremento di enterococchi antibiotico-resistenti in ambito ospedaliero ha reso le infezioni nosocomiali una delle principali sfide terapeutiche odierne.

Dunque, pur essendo generalmente organismi commensali che instaurano con l'ospite un'interazione equilibrata, tale equilibrio può venir meno, generalmente in seguito all'uso di antibatterici ad ampio spettro, i quali colpiscono i membri sensibili della comunità batterica nell'intestino umano, consentendo ad enterococchi come *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis* di divenire le specie predominanti.

Quando diventano preponderanti nel microbiota intestinale, aumentano le possibilità di una loro disseminazione nel sangue e in vari distretti corporei dove causano infezione.

Essi sono i principali responsabili di: *endocardite infettiva*, *endoftalmite*, *infezioni del tratto urinario*, *infezioni post-operatorie*, *batteriemia*, *danno del canale radicolare*.

Numerosi modelli animali sono impiegati nello studio di questi batteri, sia vertebrati che invertebrati; questi sono stati anche impiegati nello studio di nuovi composti antibatterici.

Molto rimane tuttavia da chiarire riguardo questi microrganismi, tra cui i meccanismi di patogenicità coinvolti nelle infezioni umane.

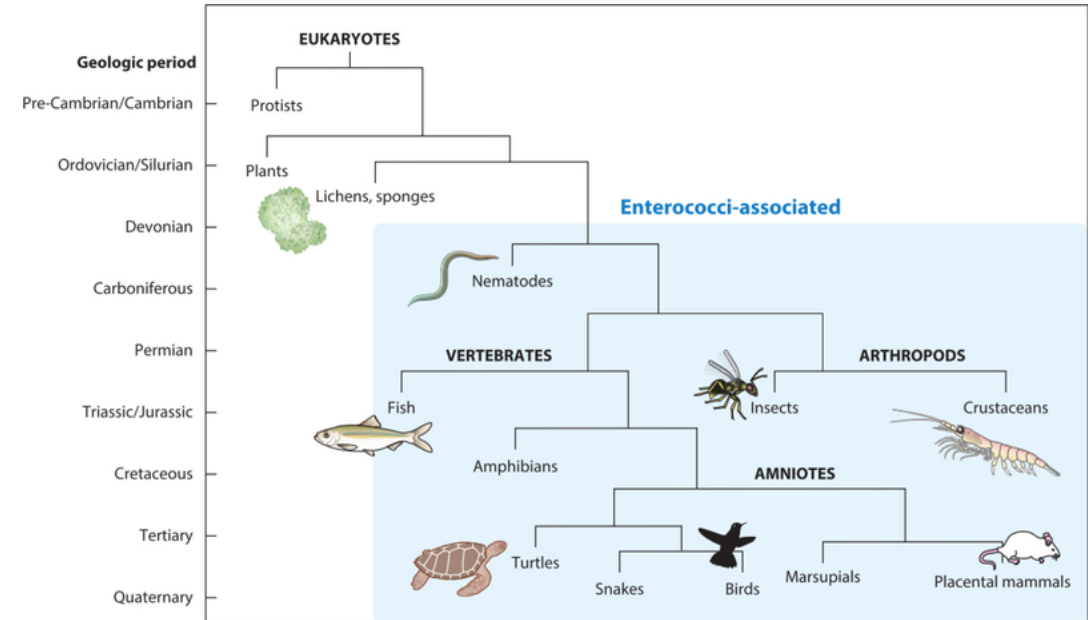
Caratteristiche:

Si tratta di :

- COCCHI GRAM POSITIVI
- FORMA GENERALMENTE ROTONDEGGIANTE, CON ORGANIZZAZIONE IN COPPIE o IN CORTE CATENELLE
- ANAEROBI FACOLTATIVI CON METABOLISMO FERMENTATIVO DI TIPO LATTICO
- MOSTRANO -EMOLISI -EMOLISI
- RISIEDONO NEL TRATTO GASTROINTESTINALE DI MOLTI ANIMALI, E DELL' UOMO
- DUE SPECIE PRINCIPALI ENTEROCOCCUS FAECALIS ED ENTEROCOCCUS FAECIUM
- DEFINITI COMMENSALI OPPORTUNISTI COMPONENTI DELLA FLORA BATTERICA NORMALE CHE IN DETERMINATE CONDIZIONI POSSONO DIVENTARE PATOGENI

La loro vasta diffusione fra animali e uomo dovuta ad una serie di proprietà intrinseche che consentono loro di sopravvivere e adattarsi :

- CAPACITA' DI REPLICARSI A pH VARIABILE DA 4,5 A 10,0
- RESISTERE NELL'AMBITO DI INTERVALLI DI TEMPERATURA DAI 10 °C AI 45 °C
- SOPRAVVIVERE AL DISSECCAMENTO
- CRESCERE IN PRESENZA DI 6,5% DI NaCl E DEL 40% DI SALI BILIARI
- SVILUPPO DI ANTIBIOTICO RESISTENZA



Fiore et al. Pathogenicity of Enterococci. Microbiol Spectrum 7(4):GPP3-0053-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018

Antibiotico-resistenza:

La sfida relativa alle malattie causate dagli enterococchi è aggravata dalla loro limitata sensibilità agli antibiotici

L'agenzia CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) degli Stati Uniti, riporta che negli Stati Uniti circa 2 milioni di persone all'anno contraggono infezioni batteriche ospedaliere e di questi circa 90.000 muiono. La maggior parte di questi patogeni nosocomiali (70%) mostra resistenza ad almeno 1 farmaco antibatterico

Circa l'origine dei geni che conferiscono antibiotico-resistenza, possiamo fare una distinzione fra:

RESISTENZA INNATA il microrganismo resistente al farmaco in virtù della sua struttura naturale o del suo metabolismo

RESISTENZA ACQUISITA eventi di trasferimento genico orizzontale causati dai cosiddetti **ELEMENTI GENETICI MOBILI** (PLASMIDI, TRASPOSONI E BATTERIOFAGI TRASDUCENTI)

RESISTENZA INNATA :

CEFALOSPORINE

AMINOGLICOSIDI (resistenza a basso livello)

STREPTOGRAMINE

LINCOSAMIDI

RESISTENZA ACQUISITA :

AMINOGLICOSIDI (resistenza ad alto livello)

VANCOMICINA

DAPTOMICINA

OSSAZOLIDINONI , LINEZOLID

GLICILCICLINA TIGECICLINA

A causa della non sensibilità ai β -lattamici, sono stati trovati nuovi approcci per il trattamento

Tutti hanno resistenza a basso livello agli aminoglicosidi. L'uso in combinazione con β -lattamici consente il killing sinergico

E' stata riscontrata resistenza ad alto livello agli aminoglicosidi

Alla fine degli anni 50' introduzione della vancomicina

Alla fine degli anni 80' prima in Europa poi negli Stati Uniti emersa la resistenza alla vancomicina

Ad oggi i ceppi VRE sono diffusi globalmente

Nel far fronte all'infezione ad opera di ceppi VRE introdotta la daptomicina

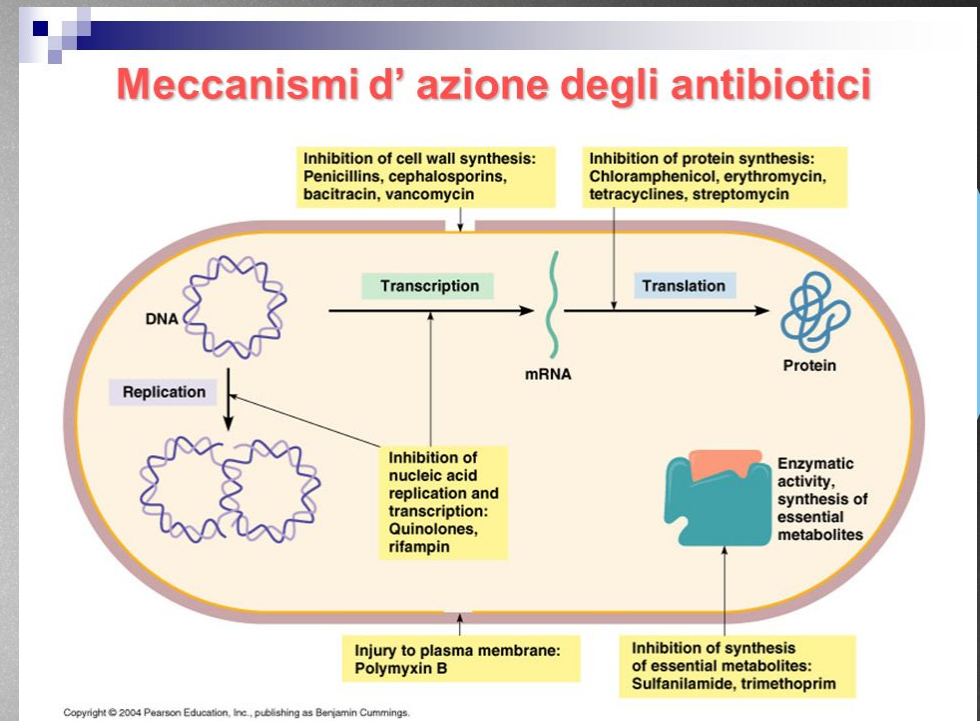
Sviluppo resistenza alla daptomicina

Nel 2000 introdotto nell'uso clinico il primo farmaco della categoria degli oxazolidinoni linezolid

Emerge la resistenza nel 2001 negli Stati Uniti e nel 2002 nel Regno Unito

Altro farmaco utile nel trattare ceppi VRE tigeiclina

E' emersa la resistenza alla tigeiclina



Meccanismi d'azione degli antibiotici - <https://slideplayer.it/slide/927218/>

Colonizzazione umana:

Gli enterococchi sono i membri principali, anche se numericamente inferiori, del microbiota umano, che tendono a sviluppare una equilibrata convivenza con l'ospite. Tuttavia, generalmente a causa dell'uso di antimicrobici, che distruggono la struttura della comunità, può verificarsi un'alterazione della composizione della flora microbica.

Con il termine RESISTENZA ALLA COLONIZZAZIONE si intendono quei meccanismi che impediscono ad un microrganismo estraneo di insediarsi in una comunità stabile e consolidate, come quella intestinale.

Una prima barriera è il pH gastrico, inospitale per la maggior parte dei microrganismi, enterococchi inclusi.

Per superare la resistenza alla colonizzazione, fondamentale è l'azione destabilizzante di antibiotici ad ampio spettro, per esempio cefalosporine o metronidazolo, a cui gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti, portando all'eliminazione dei membri sensibili che facilita il sopravvento degli enterococchi.

Anche l'espressione di fattori dell'immunità innata da parte delle cellule epiteliali dell'ospite (es. RegIII- o interleuchina IL-22) sono fondamentali per limitare la crescita di enterococchi.

I ceppi di enterococchi adattatisi all'ambiente ospedaliero sono dotati di proprietà che consentono loro di colonizzare nicchie: ceppi di *E. faecalis* ospedale - associati sono provvisti di una **idrolasi addizionale** dei sali biliari. Altri ceppi posseggono la capacità di produrre **batteriocine** codificate da elementi mobili (per es. plasmide pPD1).

La capacità di ottenere nutrienti è un ulteriore aspetto importante della colonizzazione; nell'ambito di *E. faecium*, i due clade principali, indicati come A e B, differiscono nella capacità di utilizzo dei carboidrati. Il clade A, che comprende ceppi patogeni, è in grado di utilizzare quelli associati alla mucosa intestinale più che quelli derivati dalla dieta.

Meccanismi di patogenicità degli enterococchi:

Contrastata la resistenza alla colonizzazione, dovuta ai microbi concorrenti e alle difese dell'ospite, come acidi gastrici e bile, i batteri possono colonizzare il tratto gastrointestinale; da questo serbatoio, i batteri possono aumentare in numero e diffondersi in siti vulnerabili, causando infezioni.

- TRASLOCAZIONE dall'intestino nel torrente circolatorio
- EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA dell'ospite
- DANNO TISSUTALE

Quest'ultimo step nella patogenesi dell'infezione, consistente nella produzione di cambiamenti patologici nell'ospite, i quali possono essere indotti da :

- cascata infiammatoria dell'ospite
- rilascio di tossine o proteasi
- produzione di sottoprodotti metabolici tossici

fig.1

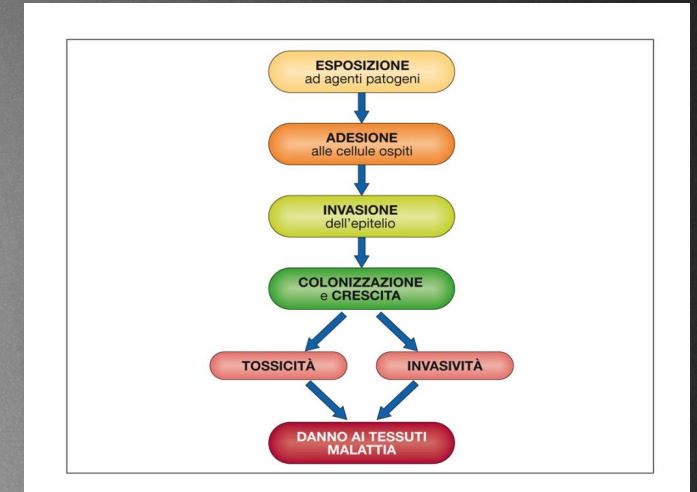


fig.2

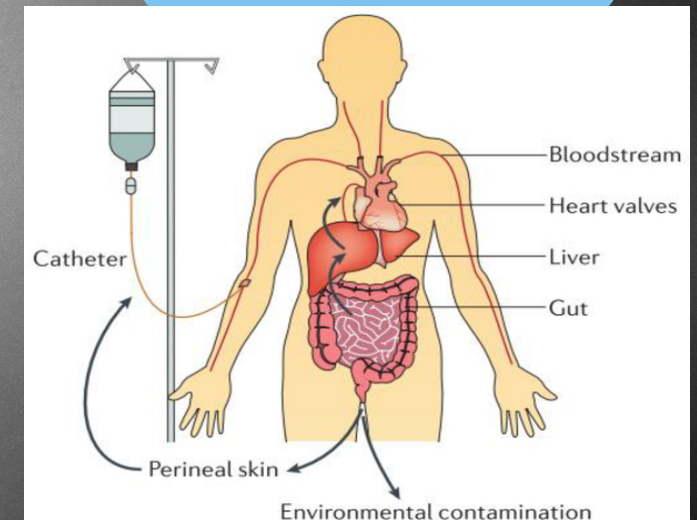


fig.1 Fasi della patogenesi - <https://docplayer.it/48898977-Patogenicit -e-virulenza-1-lezione.html>

fig.2 Fiore *et al*

. Pathogenicity of Enterococci. Microbiol Spectrum 7(4):GPP3-0053-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018

Evasione della risposta immunitaria:

Affinché gli enterococchi mantengano un'infezione e non sfuggire ai meccanismi di difesa dell'ospite specifici e non

Ciò è reso possibile dalle seguenti caratteristiche:

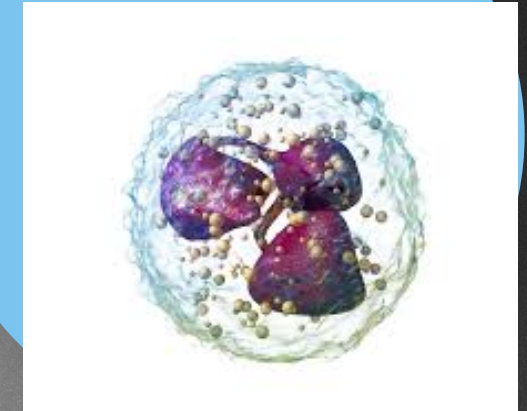
- Capsule polisaccaridiche antifagocitarie
- Proteine di superficie antifagocitarie (simili alla proteina M streptococcica del gruppo A, che previene il legame degli anticorpi);
- Tossine secrete dotate di tossicità diretta alle cellule fagocitiche

NEUTROFILI: cellula più importante per l'eliminazione dei batteri, nel corso della risposta immunitaria innata precoce.

In seguito a fagocitosi, il batterio è in grado di resistere all'uccisione intracellulare sia nei leucociti polimorfonucleati che nei macrofagi; l'AS gioca un ruolo fondamentale nel limitare l'opsonizzazione e ci consente la sopravvivenza nei fagosomi

La sopravvivenza nei macrofagi è traslocazione batterica attraverso l'epitelio intestinale e diffusione

Anche l'antigene polisaccaridico Epa contribuisce all'evasione dalla fagocitosi



Neutrofilo- <https://www.medimagazine.it/come-antibiotici-e-globuli-bianchi-lavorano-per-migliorare-uninfezione/>

Fattori di virulenza :	Descrizione :
CITOLISINA (in <i>E. faecalis</i>)	correlata alle batteriocine della famiglia dei lantibiotici, possiede doppia attività di emolisina/ batteriocina, lisa un'ampia gamma di cellule eucariotiche e Gram positive, l'operone della citolisina comprende 6 geni : la trascrizione dell' operone è repressa dai prodotti di un operone divergente, quali CYIR1 e CYIR2
GELATINASI (in <i>E. faecalis</i>)	zinco-metalloproteasi secreta, codificata dal gene gelE, regolata da un sistema di trasduzione del segnale di tipo quorum sensing, detto FSR, ove il locus fsr codifica per il fattore di regolazione FsrA
SERINA PROTEASI (in <i>E. faecalis</i>)	serina-proteasi, codificata dal gene sprE, regolata a livello trascrizionale da un sistema di trasduzione del segnale di tipo quorum sensing, detto FSR , ove il locus fsr codifica per il fattore di regolazione FsrA
IALURONIDASI (in <i>E. faecium</i>)	degrada l'acido ialuronico
Esp (in <i>E. faecalis</i> – <i>E. faecium</i>)	proteina ancorata alla parete cellulare, contribuisce alla formazione del biofilm e alla colonizzazione dell'epitelio vescicale
AS (in <i>E. faecalis</i> – <i>E. faecium</i>)	proteina ancorata alla parete cellulare, coinvolta nella coniugazione e nella adesione alle cellule eucariotiche
Acm / Ace (in rispettivamente <i>E. faecium</i> ed <i>E. faecalis</i>)	proteina ancorata alla parete cellulare, proteina legante il collagene
Epa (in <i>E. faecalis</i> – <i>E. faecium</i>)	antigene polisaccaridico enterococcico, polisaccaride antifagocitico della parete cellulare
LTA (in <i>E. faecium</i> ed <i>E. faecalis</i>)	acido lipoteicoico, corrisponde all'antigene di gruppo D (classificazione degli streptococchi), media l'adesione alle cellule ospiti, modula la risposta immunitaria dell'ospite
Cps (in <i>E. faecium</i> – <i>E. faecalis</i>)	polisaccaride capsulare, polisaccaride antifagocitico della parete cellulare
METABOLITI TOSSICI (O_2^- e H_2O_2) (in <i>E. faecium</i> – <i>E. faecalis</i>)	specie reattive dell'ossigeno che causano danni a cellule o organi; si formano come sottoprodotti di una respirazione aerobia incompleta

Meccanismi di patogenicità delle principali infezioni da enterococchi:

INFEZIONI DEL TRATTO URINARIO:

Principalmente causate da *E. faecalis* (50%), seguite da altre specie di *Enterococcus* (30%) e da *E. faecium* (20%)

- AS SOSTANZA DI AGGREGAZIONE, il sequenziamento del gene strutturale codificante per AS ha rivelato la presenza del motivo Arg-Gly-Asp-Ser che media il legame alla fibronectina **ruolo nel legame con la cellula ospite**
- ESP PROTEINA DI SUPERFICIE DI *E. faecalis* → favorisce la colonizzazione dell'epitelio della vescica
- Acm e Ace PROTEINA LEGANTE IL COLLAGNE (rispettivamente di *E. faecium* e *E. faecalis*) → adesione all'epitelio del tratto urinario attraverso il legame alle proteine della matrice extracellulare
- Pilo Ebp di *E. faecalis* → favorisce adesione all'epitelio urinario e ai cateteri urinari legando il fibrinogeno

INFEZIONI DI FERITE CHIRURGICHE - ENDOFTALMITE:

Gli enterococchi sono una causa comune di infezioni chirurgiche in tutti i siti anatomici, occhio compreso

Nella endoftalmite, la CITOLISINA è il principale fattore di virulenza che contribuisce profondamente alla distruzione dell'organo

fig.1

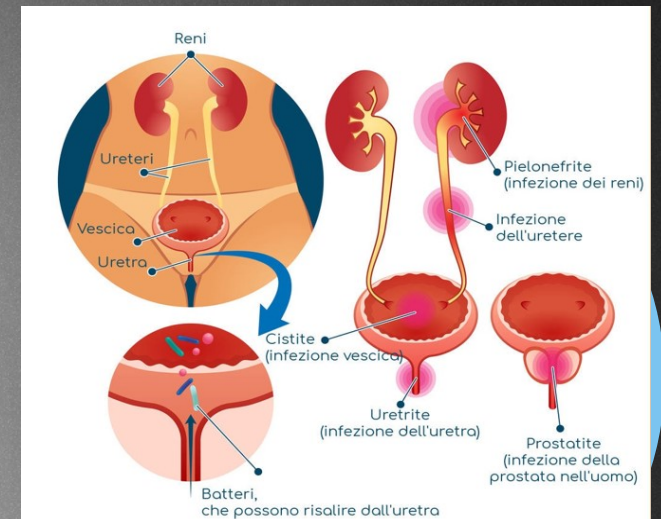


fig.2

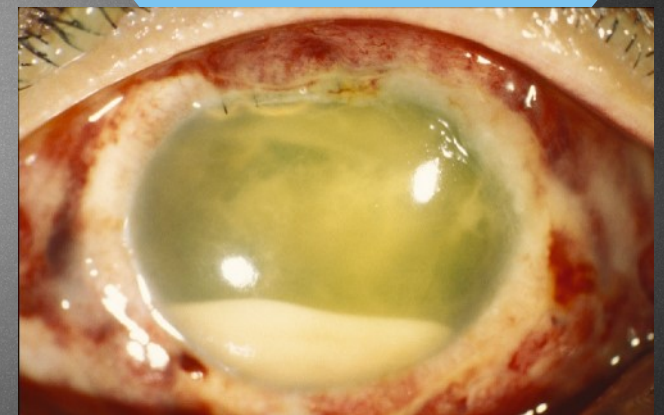


fig.1 – Infezioni del tratto urinario - <https://www.farmacocura.it/malattie/cistite-sintomi-cause-e-cura-in-bambini-ed-adulti/>
fig.2 – Infezioni di ferite chirurgiche - <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-oculari/uveite-e-disturbi-correlati/endoftalmite>

ENDOCARDITE INFETTIVA: Gli enterococchi rappresentano dal 10 al 20% di tutti i casi di IE, con *E. faecalis* che causa la maggior parte di questi

La colonizzazione batterica dell'endocardio porta alla formazione di VEGETAZIONI e alla formazione di una MATRICE BIOFILM-SIMILE, difficile da penetrare dalle cellule del sistema immunitario e dagli antibiotici

L'AS coinvolta nell'adesione al tessuto cardiaco e nella formazione del biofilm

L'antigene EfaA, un'altra adesina ed un componente del trasportatore di tipo ABC specifico per il manganese; la sua espressione aumenta durante la crescita di *E. faecalis* nel siero

Altri importanti fattori di virulenza (in *E. faecalis*) nell'IE: il pilo Ebp, importante sia nell'adesione che nella formazione del biofilm, la metalloprotease GelE, la proteina legante il collagene Ace, la proteina legante la fibronectina EfbA, la citolisina e la permeasi BepA

DANNO DEL CANALE RADICOLARE:

La resistenza a molti disinfettanti e antisettici (idrossido di calcio, EDTA, acido citrico) rende *E. faecalis* una causa importante di danno del canale radicolare

Sembra che tali batteri siano in grado di resistere alla carenza di nutrienti nel canale radicolare, per lunghi periodi di tempo, e che possano ricrescere grazie alla presenza del siero che entra nel canale dall'osso alveolare e dal legamento parodontale

Le proteasi GelE e SprE, così come la proteina legante il collagene Ace, partecipano all'adesione alla dentina e alla formazione del biofilm

Il trattamento più efficace consiste nel lavaggio prolungato del canale radicolare con ipoclorito di sodio o con soluzione di clorexidina

BATTERIEMIA:

La mortalità dovuta alla BSI enterococcica nosocomiale è piuttosto elevata e va dal 25 al 50%

Si ritiene che la maggior parte dei casi di BSI enterococcica derivi dalla traslocazione degli enterococchi dall'intestino nel flusso sanguigno

La citolisina (emolisina) di *E. faecalis* sembra contribuire all'aumento del tasso di mortalità

fig.1

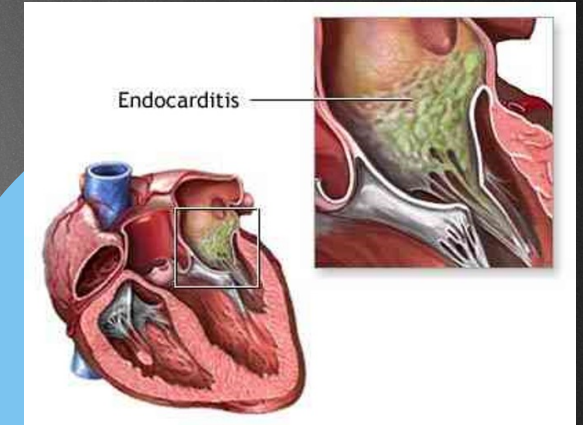


fig.2



fig.1 - Endocardite infettiva - <http://www.cardio-chirurgia.com/public/IT/endocarditi.asp>

fig.2 - Danno del canale radicolare - http://www.odontoclinic.it/carie_denti.htm

Modelli animali usati per studiare principali meccanismi di patogenicità:

INVERTEBRATI

INVERTEBRATI

Molto utilizzati grazie alla possibilità di utilizzare un gran numero di organismi in ogni esperimento e poiché sono noti per essere ospiti naturali degli enterococchi nell'ambiente.

Esempi : **C.ELEGANS; D.MELANOGASTER; G.MELLONELLA**



fig.1 C.ELEGANS



fig.2 G.MELLONELLA



fig.3 D.MELANOGASTER

Piccoli mammiferi sono stati utilizzati nello studio delle più importanti malattie enterococciche

Per esempio **per lo studio dell'IE** sono stati utilizzati **modelli di coniglio e di ratto**, i quali prevedevano l'inserimento di un catetere nella valvola cardiaca, seguito dalla somministrazione di batteri

Nello studio delle infezioni post-operatorie sono stati utilizzati **modelli di endoftalmite di coniglio**



fig.1 - https://hymanlab.mpi-cbg.de/hyman_lab/c-elegans/

fig.2 - <https://www.turbosquid.com/3d-models/drosophila-melanogaster-fruit-fly-obj/576944>

fig.3 - https://it.wikipedia.org/wiki/Galleria_mellonella

CONCLUSIONI:

L'era della medicina moderna ha creato circostanze che facilitano il comportamento patogeno degli enterococchi, attraverso 3 vie :

- A. L'uso eccessivo di farmaci antimicrobici ha selezionato batteri che sono resistenti ad essi vantaggio selettivo in ambienti come l' ospedale, che consente loro di sopraffare le altre specie
- B. Crescente popolazione di individui immunocompromessi (anziani , pazienti con trapianto di midollo osseo, pazienti con cancro) un sistema immunitario gravemente indebolito non in grado di tenere sotto controllo queste specie
- C. Fattori genetici, detti «DETERMINANTI DI VIRUENZA» (sia facenti parte del genoma principale, sia acquisiti) aumentano la capacit di sopravvivere e causare infezione

Dunque la sfida relativa alle infezioni causate dagli enterococchi risulta, ad oggi, aggravata dalla loro intrinseca resistenza e capacit di sopravvivenza anche nel caso di condizioni avverse, ovvero di composti nocivi presenti nell'ambiente da essi occupato

BIBLIOGRAFIA:

Pathogenicity of Enterococci

Elizabeth Fiore, Daria Van Tyne, and Michael S. Gilmore
Microbiol Spectrum 7(4):GPP3-0053-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018

Link immagini:

- ENTEROCOCCUSFAECIUM – <https://www.indiamart.com/proddetail/enterococcus-faecium-probiotics-8411604530.html>
- MECCANISMI D'AZIONE DEGLI ANTIBIOTICI – <https://slideplayer.it/slide/927218/>
- FASI DELLA PATOGENESI – <https://docplayer.it/48898977-Patogenicit -e-virulenza-1-lezione.html>
- NEUTROFILO – <https://www.medimagazine.it/come-antibiotici-e-globuli-bianchi-lavorano-per-migliorare-uninfezione/>
- INFEZIONE DEL TRATTO URINARIO – <https://www.farmacoecura.it/malattie/cistite-sintomi-cause-e-cura-in-bambini-ed-adulti/>
- ENDOFTALMITE – <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-oculari/uveite-e-disturbi-correlati/endoftalmite>
- ENDOCARDITE INFETTIVA – <http://www.cardio-chirurgia.com/public/IT/endocarditi.asp>
- DANNO AL CANALE RADICOLARE – http://www.odontoclinic.it/carie_denti.htm
- C.ELEGANS – https://hymanlab.mpi-cbg.de/hyman_lab/c-elegans/
- D.MELANOGASTER – <https://www.turbosquid.com/3d-models/drosophila-melanogaster-fruit-fly-obj/576944>
- G.MELLONELLA – https://it.wikipedia.org/wiki/Galleria_mellonella