



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

**Dottorato di Ricerca in  
“Alimentazione e Nutrizione umana”  
XXIV° ciclo**

---

**“Epidemiologia locale di MRSA, con riferimento alla  
circolazione di cloni ospedalieri e comunitari  
e al possibile ruolo della catena alimentare”**

---

*SSD MED/42 Igiene generale ed applicata*

Dottoranda  
Dott.ssa Daniela Maria Geraci

Coordinatore  
Prof.ssa Caterina Mammina

Tutor  
Prof.ssa Caterina Mammina



# Indice

ABSTRACT	.....	pag.6
INTRODUZIONE	.....	pag.9
Capitolo 1: <i>Staphylococcus aureus</i>	.....	pag.12
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> : caratteristiche generali	.....	pag.12
1.2 Principali quadri patologici e relativi fattori di virulenza	.....	pag.13
1.3 Colonizzazioni	.....	pag.19
Capitolo 2: Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	.....	pag.21
2.1 Resistenza alla meticillina	.....	pag.21
2.2 Health Care Associated MRSA (HA-MRSA)	.....	pag.23
2.3 Community Associated MRSA (CA-MRSA)	.....	pag.29
2.4 Livestock Associated MRSA (LA-MRSA)	.....	pag.32

OBIETTIVI	.....	pag.38
MATERIALI E METODI	.....	pag.39
Campioni biologici esaminati	.....	pag.39
Procedure microbiologiche	.....	pag.43
Tipizzazione molecolare	.....	pag.46
RISULTATI	.....	pag.60
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	.....	pag.90
BIBLIOGRAFIA	.....	pag.96



## ABSTRACT

Local epidemiology of MRSA, with reference to the circulation of hospital and community strains and the possible role of the food chain

### Introduction

The aim of this PhD project is to evaluate the local epidemiology of MRSA strains and the related risk to the healthcare environment, the community and the food production chain. According to literature, MRSA is a rising problem in different settings and new strains are spreading all over the world. In addition to HA-MRSA, CA-MRSA e LA-MRSA are new important problems to face. In this contest, this study is focused to estimate the frequency of isolation of MRSA in different kind of samples and to analyze the main features of the collected strains. Comparing the isolates each other, it is possible to underline similarities and correlations and finally understand their specify identity.

### Materials and methods

MRSA strains were isolated using Brain Hearth Infusion (BHI) broth and mannitol salt agar plates. After a further incubation at 35°C for 48 h, suspected colonies were confirmed to be *S. aureus* and tested for resistance in Müller-Hinton agar with oxacillin (6 µg/ml). MRSA strains are analyzed with antibiograms (Kirby-Bauer), E-test and D-test. Molecular typing techniques as MLVA, PCR multiplex for SCCmec determination, MLST, PCR for *tst-I* were used for the isolated MRSA. A selection of strains is analyzed with microarray, whole genome sequencing and *spa* typing.

### Results

Between January 2010 and December 2013 samples of different origin were collected and MRSA was detected. In details, we analyzed: 145 food samples, 71 animal samples, 2452 nasal swabs from the children hospitalized in the NICU (Neonatal Intensive Care Unit) in the University Hospital of Palermo and 500 nasal swabs from healthy children up to 3 years old attending public nursery schools in Palermo.

From food and animal samples none MRSA was isolated. Within the food samples 12 MSSA strains were collected (8.3%).

The study developed in collaboration with the NICU takes is based upon a four-year surveillance program started in June 2009 and now still ongoing. The frequencies of colonization of MRSA fell from 27% in the first year of study 2009/10 to 10% in the fourth years 2012/2013. In contrast, the rate of colonization of MSSA rose from 5% to 16% in the same four-year period. Most of the isolated MRSA do not have important antibiotic resistances and were recognized with a particular MLVA profile. The dominant strain is identified with MLST as ST22 and *SSCmec* IVa with PCR multiplex for *SCCmec* determination. This strain was identified with microarray as CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 “Middle Eastern Variant” and confirmed by *tst-1* PCR. The whole genome sequencing was used to estimate the presence of about 350-400 SNPs between a selection of strain collected from 2009 to 2013. To have a whole sight of the situation in the NICU it is useful to specify that different MRSA strains were identified during the study and we want to underline especially the spreading of CA-MRSA ST1 for almost five months with 14 cases of colonization.

The study in healthy children attending the nursery schools detected 10 MRSA (2%) and 68 MSSA (13.6%). These ten children positive for MRSA were attending nine different day care centers. No association with specific risk factors was found. Eight MRSA isolates were *tst1+* as CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 “Middle Eastern Variant” and identified by *spa* typing as *spa* t223. The other two isolates were identified ST1-IVa and ST398-V. They tested negative for PVL and *tst1* genes and were resistant to clindamycin and erythromycin. ST398-V was also vancomycin resistant with MIC of 3 mg/L. Two isolates, ST22-IVa and ST1-IVa respectively, were recovered from two children attending the same day care center. None of the family members of the child carrying ST398-MRSA-V reported any exposure to livestock.

## Conclusions

The exposure to the hospital environment is the main risk factor for MRSA. The colonization rates are considerably higher in the NICU than in the nursery schools (10% vs 2% in the last year of study). On the other hand, the emergent spreading of MRSA in the community should be monitored locally.

In this study it is demonstrated the circulation of the same MRSA strain CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 “Middle Eastern Variant” *spa* t223 in the NICU and in the nursery schools. A single MRSA strain is able to spread in hospital and community setting as an evidence of the great ability to adaptation. This same strain was before identified in Abu

Dhabi and USA from foreign people. In this contest, our evaluation of the local epidemiology of MRSA is very important to understand what is happening globally and what we may expect for the future. In addition, the surveillance program done in the NICU was a very helpful tool to control the circulation of MRSA and reduce the rate of colonization and the study in the nursery schools is important to evaluate the situation in the community.



## INTRODUZIONE

Questo progetto di ricerca prende spunto dai recenti cambiamenti nell'epidemiologia di MRSA e si sviluppa con l'obiettivo di indagare a fondo l'epidemiologia locale considerando il rischio correlato alla catena alimentare, agli animali da allevamento, all'ambiente ospedaliero e nella popolazione generale. Dal primo isolamento del 1961 ad oggi numerosi cloni di MRSA circolano in tutto il mondo; negli anni '70 e '80 si trattava principalmente di ceppi responsabili di infezioni nosocomiali mentre negli anni '90 furono identificati i primi casi in comunità. È chiaro che nei primi decenni MRSA venne inquadrato tra i microrganismi patogeni responsabili delle infezioni nosocomiali ed indicato come Health Care Associated MRSA (HA-MRSA); col passare degli anni tra la grande varietà dei ceppi circolanti si iniziarono a riconoscere MRSA con potenzialità epidemica (EMRSA). Infezioni MRSA nella popolazione generale in assenza di particolari fattori di rischio sono state registrate a partire dagli anni '90, in particolare in Australia nel 1993 e USA tra il 1997 e il 1999, e i ceppi isolati sono stati indicati come Community Associated MRSA in sigla CA-MRSA. Molti studi mostrano che la diffusione di CA-MRSA varia da Paese in Paese; i Paesi ad elevata circolazione di HA-MRSA come l'Italia sono generalmente caratterizzati da basse percentuali di CA-MRSA (1-2%) e viceversa Paesi a bassa circolazione di HA-MRSA come la Danimarca presentano elevate percentuali di CA-MRSA (29%). Dal 2005 MRSA è stato identificato anche in casi di colonizzazione e infezione in molte specie animali ed in particolare tra gli animali di allevamento. Si tratta nello specifico di un ceppo di origine animale detto CC398 anche noto come "livestock-associated" MRSA (LA-MRSA) inizialmente identificato nei suini, nel pollame e nei vitelli allevati con sistema intensivo in Europa ed oggi emergente in molti Paesi come Belgio, Danimarca e Canada.

Tutti questi fenomeni sono guidati dalla grande spinta selettiva associata all'eccessivo e sregolato utilizzo di antibiotici in ogni contesto. Per una valutazione quantitativa del problema si tenga presente che negli USA sono prodotte circa 23.000 tonnellate di antibiotici all'anno (15.700 tonnellate nel 1980), la metà per impiego terapeutico nell'uomo (solo per la metà ritenuto appropriato) e l'altra metà per la promozione della crescita di animali e per il trattamento con aerosol di alberi da frutto (figura 1).

L'utilizzo massivo di antibiotici negli allevamenti intensivi, sia a scopo terapeutico che come promotori della crescita (quest'ultimo oggi vietato), per molti anni ha creato una forte pressione selettiva che ha portato all'emergenza dei microrganismi farmaco-resistenti in tale contesto. A ciò deve aggiungersi il fatto che la percezione del problema è stata maggiormente

orientata a definire e limitare la presenza di residui di antibiotici negli alimenti di origine animale quindi verso un rischio di natura chimica più che biologica. Il tutto è testimoniato dal del Decreto Legislativo 158/2006, che recepisce le Direttive comunitarie 96/22/CE e 96/23/CE che nell'allegato I include tutte le sostanze antibatteriche nella categoria B come residui da ricercare nei campioni da controllare. Per molti anni si è tralasciato l'effetto che gli antibiotici hanno sulla popolazione microbica che colonizza e/o infetta gli animali da allevamento e quindi la possibile insorgenza di ceppi farmaco-resistenti. Tale problema è stato riconosciuto con la Direttiva CE 99/2003 recepita in Italia con il Decreto Legislativo 191/2006 che obbliga ad attivare un sistema di sorveglianza per l'antibiotico resistenza in agenti patogeni sia di origine umana che animale.

Alla luce di quanto detto, bisogna avere consapevolezza dell'impatto del fenomeno della resistenza agli antibiotici sulla salute della popolazione e che tale fenomeno deve essere considerato sotto diversi punti di vista:

- difficoltà nel trattamento delle infezioni;
- maggiore diffusione delle infezioni;
- impedimento nell'esecuzione di interventi terapeutici di rilievo;
- aumentati costi.

Bisognerebbe intraprendere azioni capaci di ridurre l'uso degli antimicrobici in tutti i settori di impiego: medicina umana e veterinaria, produzione animale e protezione di piante. Nell'uomo dovrebbe essere evitato l'uso di antimicrobici a largo spettro non necessari (ad es. nelle infezioni urinarie). Ridotte permanenze ospedaliere, trattamento domiciliare (ove possibile) di pazienti con malattie serie o complicate, aumentato trasferimento a strutture per degenze prolungate, intensificazione degli schemi di pulizia e ricorso a stanze singole, sono tutti fattori che possono ridurre in assoluto l'insorgenza ed il trasferimento di resistenze in ospedale e nel rapporto ospedale-territorio.

È necessario poi cercare di ottimizzare l'approccio prescrittivo abituale degli antimicrobici. Ciò può esser ottenuto in diversi modi: nel medio periodo, migliorando e rendendo più sensibili e con risultati più rapidi possibili i test diagnostici per le malattie infettive, onde instaurare in tempi brevi una terapia con antimicrobici mirati; nel lungo periodo, rivisitando totalmente con inventiva gli schemi terapeutici finora adottati per i trattamenti con antimicrobici di malattie infettive, senza seguire soltanto quelli derivanti dai trial clinici finanziati dalle industrie produttrici.

Figura 1 : MRSA



L'attività di ricerca è stata svolta presso il Dipartimento di Scienze della Promozione della Salute e Materno-infantile "G.D'Alessandro" Sezione di Igiene. Tramite la raccolta ed analisi di campioni biologici di varia natura, è stata stimata la circolazione di ceppi MRSA e la loro associazione con la catena alimentare o altri specifici fattori di rischio. I ceppi MRSA raccolti sono analizzati nel dettaglio per conoscere altre eventuali antibiotico-resistenze e per ottenere un'identificazione completa e accurata. Inoltre, l'Italia rientra tra le aree geografiche ad elevata frequenza di isolamento di HA-MRSA. In questo contesto, è estremamente utile stimare le frequenze di colonizzazione in ambiente ospedaliero e l'emergente diffusione nella popolazione generale. L'obiettivo finale è quello di ottenere una valutazione completa sull'epidemiologia locale, identificando i principali ceppi circolanti e l'impatto che essi hanno sulla salute dell'uomo.

## Capitolo 1: 1 *Staphylococcus aureus*

### 1.1 *Staphylococcus aureus*: caratteristiche generali

*Staphylococcus aureus* è la specie di maggior rilievo all'interno del genere *Staphylococcus* (tabella1) responsabile della maggior parte delle infezioni da stafilococchi nell'uomo.

**Tabella1: Classificazione tassonomica**

Classificazione tassonomica	
Dominio:	Prokaryota
Regno:	Bacteria
Phylum:	Firmicutes
Classe:	Bacilli
Ordine:	Bacillales
Famiglia:	<i>Staphylococcaceae</i>
Genere:	<i>Staphylococcus</i>

Al genere *Staphylococcus* appartengono 32 specie strettamente correlate sulla base della composizione del DNA; di queste solo 17 sono associate all'uomo. *S. aureus* è l'unica specie che produce la coagulasi ed in base a questa caratteristica può essere facilmente distinta dalle altre.

Il termine *staphyle* deriva dal greco e significa grappolo d'uva mentre il nome della specie *aureus* deriva dal caratteristico pigmento giallo oro presentato dalle colonie in terreno solido. *S. aureus* possiede tutte le caratteristiche proprie degli stafilococchi; sono batteri di forma sferica, riuniti in genere in ammassi irregolari, spesso dall'aspetto di grappoli, del diametro di 0,8-1  $\mu\text{m}$ . Immobili, dotati di una capsula non sempre evidente, asporigeni, Gram-positivi, crescono bene nei comuni terreni di coltura. Su terreni solidi producono colonie di 2-3 mm di diametro, rotonde e a margini netti, convesse, opache e con pigmentazione aurea, bianca o più raramente citrea. Il loro sviluppo ha luogo fra 10 e 45 °C, con un optimum di temperatura compreso tra i 30 e i 37 °C e, per quanto riguarda il PH fra 4 e 9 con un optimum tra 7,0 e 7,5. Da un punto di vista metabolico sono aerobi-anaerobi facoltativi; catalasi positivi. Aerobicamente dal glucosio producono molto acido acetico ed anidride carbonica e poco acido lattico (5-10%) mentre anaerobicamente producono essenzialmente acido lattico (73-94%) e poco acido acetico (4-7%). Sono batteri ubiquitari e sopravvivono a condizioni estreme quali secchezza, calore, bassa tensione di ossigeno e ambienti altamente salini. Mostrano una notevole alofilia che li rende capaci di svilupparsi anche in presenza di concentrazioni elevate di NaCl (7,5%) tali da inibire lo sviluppo di altri batteri (1).

## 1.2 Principali quadri patologici e relativi fattori di virulenza

*S. aureus* è un batterio ampiamente diffuso in molte specie animali e nell'uomo; potenzialmente patogeno, può causare una gran varietà di quadri patologici che si differenziano notevolmente fra di loro per la sede del processo infettivo e le sue modalità di diffusione (tabella 2). La gravità e l'esito della patologia dipendono dalla virulenza del ceppo e dalla condizione immunitaria dell'ospite.

**Tabella 2: Principali quadri patologici da *Staphylococcus aureus***

- cute e tessuti molli: foruncoli, infezioni di ferite chirurgiche o traumatiche
- apparato scheletrico: osteomielite (ferite penetranti, fratture e apparecchi ortopedici possono introdurre il microrganismo direttamente all'osso)
- apparato respiratorio: polmonite
- apparato circolatorio: endocardite (soprattutto in seguito a chirurgia cardiaca o cateterismo)
- apparato genitale-urinario: ascesso renale, infezione delle basse vie urinarie
- sistema nervoso centrale: ascessi cerebrali ed epidurali
- apparato digerente: tossinfezione alimentare (gastroenterite)

Il microrganismo può causare malattia per invasione dei tessuti o per produzione di tossine. Nelle forme da invasione il segno distintivo è l'ascesso che consiste in un muro di fibrina, circondato dai tessuti lesi, contenente un nucleo centrale di batteri e leucociti. Dal sito dell'infezione la diffusione avviene per via ematogena. Nelle forme da tossina si evidenziano tre sindromi: toxic shock syndrome dovuta alla tossina da shock tossico; scalded skin syndrome dovuta alla tossina esfoliativa o anche detta epidermolitica, intossicazione alimentare dovuta alle enterotossine.

Nel determinare l'azione patogena concorrono numerosi fattori di virulenza quali:

- esotossine (tabella 3),
- esoenzimi (tabella 4).

**Tabella 3: Esotossine**

Esotossine e rispettive azioni:	
alfa-emolisina	polimerizza in eptameri che si inseriscono in membrana costituendo dei pori e di seguito causa la lisi osmotica della cellula.
beta-emolisina	causa la lisi delle piastrine ma non dei leucociti; probabilmente ha una attività di sfingomielasi ed idrolizza i lipidi di membrana.
delta-emolisina	ha una azione litica su emazie di numerose specie animali; agisce con un meccanismo simile ai detergenti.
gamma-emolisina	è costituita da due proteine con analoghe caratteristiche fisico-chimiche; risulta attiva sulle emazie di coniglio e di pecora ma il suo ruolo patogenetico è ancora sconosciuto.
leucocidina	è costituita da due proteine F e S che hanno azione sinergica nella distruzione dei leucociti. Agisce in maniera analoga all'alfa emolisina: formando pori nella membrana causa la lisi osmotica della cellula.
enterotossine	sono un gruppo di proteine a basso peso molecolare, simili strutturalmente e funzionalmente ma antigenicamente distinte. Si conoscono diversi sierotipi: A, B, C (con i tre sottotipi C1,C2,C3), D, E, G, H. Sono resistenti all'azione di molti enzimi proteolitici e al calore; sono in grado di sopportare un'esposizione a 100°C per 15 minuti. Causano nell'uomo gastroenterite e intossicazione alimentare caratterizzata da vomito ed in alcuni casi anche diarrea dopo 1-6 ore dall'ingestione di alimenti contaminati. Agiscono come emetici centrali; sono in grado di stimolare i nervi simpatici e il nervo vago che conducono il segnale fino ai centri sottocorticali di controllo del vomito.
tossina esfoliativa o epidermolitica	è la causa della cosiddetta sindrome della cute (pseudo)ustionata da stafilococco (staphylococcal scalded skin syndrome o SSSS), conosciuta anche come malattia di Ritter o malattia di Lyell. E' una patologia tipica degli infanti ed è dovuta alla diffusione tramite il sangue della tossina (indipendente, quindi, dalla reale posizione dei batteri nell'organismo). L'azione dannosa, risultante esattamente come ampie ustioni sulla pelle, è data dall'interazione con le

tossina esfoliativa o epidermolitica	proteine della matrice intercellulare e rottura dei desmosomi a livello dello strato granuloso dell'epidermide: la stabilità dello strato è compromessa e la pelle si danneggia al minimo insulto meccanico. Sono state identificate due forme della tossina: A e B. La A è codificata da un gene a localizzazione cromosomica mentre la B da un gene a localizzazione plasmidica; entrambe sono probabilmente delle serino-proteasi.
tossina da shock tossico	determina il cosiddetto shock tossico da stafilococco che vede la comparsa di sintomi gravi generalizzati, malfunzionamento di molti organi, manifestazioni eritematose, sintomi da shock emodinamico e associata ad un'elevata mortalità.

**Tabella 4: Esoenzimi**

Esoenzimi e rispettive azioni:	
la coagulasi	garantisce la protezione del batterio che si annida nel coagulo
la ialuronidasi	è in grado di degradare l'acido ialuronico presente nel tessuto connettivo ed è molto importante per la diffusione del batterio o delle tossine da esso prodotte nel tessuto dell'ospite.
la stafilochinasi	è in grado di attivare il plasimogeno in plasmina, indurre quindi il disfacimento dei coaguli favorendo la diffusione del batterio.
varie proteasi, enzimi lipolitici, DNAsi, ureasi	Sono in grado di degradare varie molecole (e macromolecole) target

Le enterotossine, la tossina epidermolitica e la tossina da shock tossico sono superantigeni e come tali agiscono andandosi a legare all'MHC di II° classe dei macrofagi e alla porzione variabile del TCR dei linfociti T helper. Causano l'attivazione policlonale dei linfociti T, una risposta immunitaria sproporzionata che può avere conseguenze molto gravi.(1)

La TSST-1 e le enterotossine inoltre condividono proprietà importanti sono tutti pirogeni, hanno un analogo sistema di controllo nell'espressione genica e come prodotti proteici subiscono clivaggio prima dell'esportazione al di fuori della cellula.

La sindrome da shock tossico fu per la prima volta descritta nel 1978 in un gruppo di bambini come un' infezione sistemica da ceppi di *S.aureus* non invasivi. Intorno al 1980 si verificarono numerosi casi in USA in donne con mestruazioni utilizzatrici di tamponi dove venne riscontrata la presenza di *S.aureus* a livello vaginale o cervicale. L'assenza di batteriemia in queste pazienti portò a pensare a una forma di intossicazione e al coinvolgimento di una tossina nella patogenesi della malattia. La tossina responsabile della sindrome fu anticamente identificata come enterotossina F e esotossina pirogena C oggi è a tutti nota con il nome di tossina della sindrome da shock tossico in sigla TSST-1. Codificata dal gene *tstH* (H si riferisce all'isolato umano) di 15.2 kb, TSST-1 è un polipeptide di 194AA, peso molecolare di 22.000 e punto isoelettrico di 7.2 (2,3).

Secondo le conoscenze attuali il gene *tst* si trova all'interno di un'isola di patogenicità e con essa tramite specifici batteriofagi può essere veicolata tra un batterio e un altro.

In generale la maggior parte dei geni codificanti per fattori di virulenza e antibiotico resistenza dello *S.aureus* sono localizzati su elementi mobili del genoma ed è stato stimato che costituiscano circa il 20% del genoma completo. Così la grande plasticità del genoma dello *S.aureus* si riflette nelle diverse combinazioni di elementi mobili del genoma (MGEs) e di seguito nella grande varietà di organismi ospiti, nicchie ecologiche e forme di infezione (4,5).

Le enterotossine prodotte da *S.aureus* sono nove A, B, C1,C2,C3, D, E, G, H e tra queste particolare rilievo hanno la A e la D responsabili della maggior parte delle tossinfezioni alimentari da *S.aureus* nell'uomo. Le enterotossine sono termostabili e a livello intestinale agiscono scatenando l'infiammazione e di seguito la stimolazione delle vie nervose che inducono il riflesso del vomito.

Sintomo comune è proprio il vomito e la febbre e solo raramente si riscontra diarrea; l'esordio è immediato (30 minuti-8 ore) e la prognosi è buona: tutti i segni si esauriscono entro 1-2 giorni. Gli alimenti coinvolti generalmente sono carne, latte, formaggi, creme, condimenti, salse, gelati e dolci e la contaminazione generalmente avviene dopo la cottura per una non corretta



manipolazione degli alimenti. Inoltre l'ampia diffusione dei soggetti colonizzati e le capacità del microrganismo di sopravvivere a condizioni estreme di temperatura, PH e acqua libera creano le condizioni idonee per la diffusione delle tossinfezioni da *S.aureus*. Le misure preventive prevedono il raffreddamento rapido degli alimenti in piccola pezzatura, il mantenimento dei cibi caldi a temperature superiori a 60°C e di quelli freddi a temperature inferiori a 4°C e se possibile gli alimenti devono essere preparati il giorno stesso in cui vengono consumati (6,7).

A tutti i fattori finora descritti è opportuno aggiungere le adesine (proteiche e non proteiche) che giocano un ruolo chiave nell'interazione dello *S.aureus* con l'organismo ospite colonizzato o infetto. Le adesine di natura non proteica comprendono il polisaccaride PIA (polysaccharide intercellular adhesin), acido teicoico e acido lipoteicoico.

Le adesine di natura proteica possono essere a sua volta suddivise in due gruppi:

- la famiglia MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) proteine legate covalentemente alla superficie batterica. Sono più di 20 proteine che riconoscono le componenti della matrice extracellulare (tabella 5);
- la famiglia delle proteine SERAM (secretable expanded repertoire adhesive molecules), le membrane-spanning proteins e le autolisine/adesine con funzione sia di adesione che enzimatica (amidasi e glucosaminidasi). Tutte queste molecole sono proteine associate alla superficie batterica attraverso interazioni idrofobiche o legami ionici (tabella 6).

**Tabella 5: Le proteine della famiglia MSCRAMM**

MSCRAMM	Interazione	Funzione
Fibronectin binding proteins A e B (FnbpA e FnbpB)	Adesione alla fibronectina, fibrinogeno e ECM	Mediano l'ingresso dei batteri in cellule non fagocitiche
Collagen binding protein (Cna)	Lega il collagene di tipo I e IV. Necessaria per l'adesione al tessuto connettivo e alla cartilagine	Contribuisce allo sviluppo dell'artrite settica
Clumping factor A e B (ClfA e ClfB)	Legano il fibrinogeno	Necessari per il clumping con conseguente funzione anti-fagocitica; mediano l'interazione con le cellule epiteliali e la colonizzazione dei tessuti
Plasma –sensitive surface protein (Pis)	Dopo essere stata processata dalla plasmina, partecipa al legame con il fibrinogeno e con la fibronectina	Causa il fenotipo non aderente di alcuni ceppi MRSA
Serine-aspartic acid- rich proteins (Sdr proteins)	Legano ECM	Associato alla colonizzazione a livello nasale
S. aureus surface proteins	Legano ECM	Associato alla colonizzazione a livello nasale
Proteina A (Spa)	Lega il dominio Fc delle immunoglobuline (IgG), il fattore di Willebrand, il TNFR1 e il gC1q-R eucariotico	Ostacola l'opsonizzazione e la fagocitosi; modula il segnale TNF; è coinvolta nell'insorgenza della polmonite

**Tabella 6: Le proteine della famiglia SERAM**

SERAM	Interazione	Funzione
Extracellular adherence protein (Eap)	Lega le molecole ECM ed il recettore ICAM-1	Blocca il reclutamento dei neutrofili e delle cellule T; inibisce la proliferazione delle cellule T
Coagulasi (Coa)	Attiva la protrombina	Il batterio si annida nel coagulo
Proteine leganti ECM (Emp)	Interagiscono con ECM	Sconosciuta
Extracellular fibrinogen binding protein (Efb)	Lega il fibrinogeno e i fattori del complement C3b e C3d	Inibisce il complemento; blocca l'opsonizzazione e la fagocitosi

Infine catalasi e la superossidodismutasi rendono il batterio resistente alla fagocitosi poiché in grado di neutralizzare e degradare il superossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) (8,9,10,11).

### 1.3 Colonizzazioni

Alla luce di tutte queste informazioni e consapevoli della possibile virulenza del microrganismo è importante sottolineare che lo *Staphylococcus aureus* può riscontrarsi nell'uomo in assenza di manifestazioni morbose a livello cutaneo e naso-faringeo; tale condizione è indicata con il termine di portatore sano. Lo stato di portatore può essere transitorio o intermittente, benché sia stato dimostrato che vi sono degli individui che ospitano questi microrganismi continuamente o per periodi molto lunghi.

Generalmente i soggetti portatori sani si suddividono in due gruppi:

- portatori ad alto rischio cioè con colonizzazione persistente;
- portatori a basso rischio cioè con colonizzazione intermittente o del tutto assente.

Si stima che il microrganismo colonizzi l'80% della popolazione, di cui il 20% stabilmente ed il 60% ad intermittenza, mentre un 20% non verrebbe mai colonizzato.

Numerosi fattori giocano un ruolo chiave nel processo di colonizzazione e nella sua persistenza: fattori relativi all'organismo ospite responsabili dell'adesione e della permanenza del microrganismo senza attivazione della risposta immunitaria e fattori relativi allo stipite batterico come la capacità riproduttiva.

La colonizzazione è certamente molto più comune delle infezioni ma deve essere identificata come il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo di infezioni da *S.aureus* in ospedale e in comunità.

Il nesso tra colonizzazione nasale ed lo sviluppo di un'infezione è dimostrato da tre dati importanti:

- la frequenza delle infezioni tra gli individui colonizzati è maggiore rispetto ai non colonizzati;
- i ceppi isolati dai siti di colonizzazione ed infezione di uno stesso paziente sono generalmente identici;
- la decolonizzazione nasale generalmente si accompagna alla riduzione delle infezioni nel contesto ospedaliero (12).

Lo stato di colonizzazione nasale è molto rilevante nel caso si tratti di ceppi antibiotico resistenti e multi-resistenti isolati all'interno delle strutture ospedaliere. All'interno di un ospedale infatti un paziente o un membro del personale sanitario colonizzato non è solo un soggetto a rischio di infezione ma è serbatoio del microrganismo e come tale ne facilita la

diffusione all'interno della struttura. Nell'approccio pratico il soggetto colonizzato, non presentando nessuna manifestazione clinica, non è immediatamente identificabile se non con un apposito screening. Nasce da qui l'esigenza di realizzare piani di sorveglianza delle colonizzazioni mirati alla tutela della salute e a garanzia della qualità del sistema sanitario. Il monitoraggio delle colonizzazioni e l'eventuale decolonizzazione nasale può essere uno dei pochi strumenti realmente efficaci per evitare lo sviluppo di infezioni, identificare i ceppi circolanti, studiarne le caratteristiche e possibilmente sfruttarle nella pratica clinica (terapia antibiotica, interventi di controllo e prevenzione).

## Capitolo 2: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

### 2.1 Resistenza alla meticillina

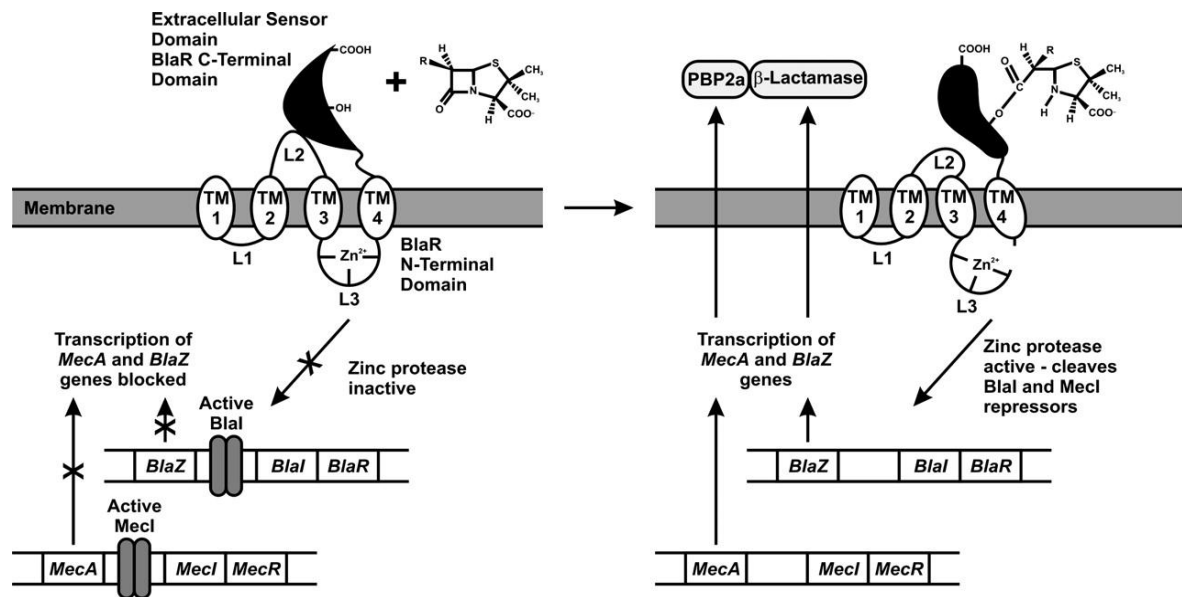
La penicillina, scoperta da Alexander Fleming nel 1928, è universalmente riconosciuta come il primo trattamento realmente efficace contro le infezioni stafilococciche. Ad essa si deve il concetto di antibiotico dei nostri giorni e lo sviluppo di tutti gli altri antibiotici  $\beta$ -lattamici. Sfortunatamente lo sviluppo della resistenza, dovuto alla trasmissione dei geni codificanti per le  $\beta$ -lattamasi, fu molto rapido e di conseguenza negli anni successivi vennero prodotte le penicilline semisintetiche, non idrolizzabili dalle  $\beta$ -lattamasi, come la meticillina e l'oxacillina. La meticillina fu introdotta nella pratica clinica nel 1959 e solo due anni dopo fu isolato il primo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA). Questo tipo di resistenza è acquisita con il gene *mecA* codificata per una proteina di legame alle penicilline alternativa indicata come PBP2a, dotata di ridotta affinità per gli antibiotici  $\beta$ -lattamici mantiene la propria funzionalità nella sintesi della parete batterica (13).

Il gene *mecA* viene trasmesso per via orizzontale tra ceppi *S.aureus* meticillino resistenti (MRSA) e sensibili (MSSA) contenuto, insieme a geni regolatori, all'interno di un elemento mobile del genoma denominato Staphylococcal chromosome cassette *mec* in sigla SCC*mec*. L'origine di questo gene è oggetto di numerose discussioni e probabilmente è da identificarsi nei geni *mecA* di stafilococchi coagulasi negativi come *S.fleurettii* (99,8% di corrispondenza nelle sequenze nucleotidiche).

Oltre al gene *mecA*, all'interno della cassetta SCC*mec* sono presenti altri geni *mec* regolatori *mecRI* e *mecI* e geni *ccr* codificanti per la ricombinasi (*ccr*) che media l'excisione della cassetta e la sua inserzione, pertanto responsabile della sua mobilità. Le regioni fiancheggianti i complessi *mec* e *ccr* sono indicate come regioni J (junkyard) e non sembrano essere essenziali o utili per le cellule batteriche ad eccezione di alcuni casi in cui contengono geni per la resistenza ad altri antibiotici.

Il gene *mecA* è regolato dal repressore *mecI* e da un trasduttore del segnale transmembrana, *mecR*, sensibile ai  $\beta$ -lattamici. In assenza di antibiotici  $\beta$ -lattamici, *mecI* reprime la trascrizione di tutti i geni del complesso *mec* (non solo *mecA*, ma anche *mecR* e *mecI*). In presenza di  $\beta$ -lattamici, *mecR* attiva, mediante taglio autocatalitico, il dominio metalloproteasi citoplasmatico, il quale scinde il legame fra *mecI* e la regione dell'operatore del gene *mecA*, consentendo la sua trascrizione e, di conseguenza, la produzione di PBP2a (figura 2).

Figura 2: Meccanismo di regolazione dell'espressione del gene *mecA*



Dalla combinazione delle diverse varianti di geni *ccr* e *mec* si originano diversi tipi di cassette SCCmec; inoltre in base ai polimorfismi delle regioni di giunzione si distinguono diversi sottotipi (tabella 7). Tutte le varianti di cassette SCCmec presentano sequenze ripetute ed invertite alle estremità e specifici siti di integrazione nel genoma batterico (14,15).

Tabella 7: Classificazione SCCmec

SCCmec tipo	Geni <i>ccr</i>	Geni <i>mec</i>	Sottotipi	Contenuto regioni J
I	1 (A1B1)	B	I	J1, ORFs sottotipo1, J3, <i>dcs</i>
			I.2	J1, ORFs sottotipo1, J3, <i>dcs</i> , pUB110
II	2 (A2B2)	A	II	J1, ORFs sottotipo1, J2, ORFs sottotipo1 e Tn554, J3, <i>dcs</i> e pUB110
			IIb	J1, ORFs sottotipo2, J2, ORFs sottotipo1 e Tn554, J3, <i>dcs</i>
			IIb	J1, ORFs sottotipo3, J2, ORFs sottotipo1, J3, <i>dcs</i> e pUB110
			IIe	J1, ORFs sottotipo3, J2, J2 tronca e Tn554, J3, <i>dcs</i> e pUB110
			II.4.1.1	J1, ORFs sottotipo4, J2, ORFs sottotipo1 e Tn554, J3, <i>dcs</i> e pUB110
III	3 (A3B3)	A	III	J1, ORFs sottotipo1, J2, ORFs sottotipo1 e ΨTn554, J3, ORFs sottotipo1, pT181
			IIIA	J1, ORFs sottotipo1, J2, ORFs sottotipo1 e ΨTn554, J3, ORFs sottotipo1, pT181 e SCCHg con <i>ccrC</i>

IV	2 (A2B2)	B	IVa	J1, ORFs sottotipo1, J3, <i>dcs</i>
			IVb	J1, ORFs sottotipo2, J3, <i>dcs</i>
			IVc	J1, ORFs sottotipo3, J3, <i>dcs</i> e Tn4001
			IVc	J1, ORFs sottotipo3, J3, <i>dcs</i>
			IVA	J1, ORFs sottotipo1, J3, <i>dcs</i> e pUB110
			IVE	J1, ORFs sottotipo3, J3, ORFs sottotipo2
			IVd	J1, ORFs sottotipo4, J3, <i>dcs</i>
			IVg	J1, ORFs sottotipo5, J3, <i>dcs</i>
			IVh	J1, ORFs sottotipo6, J3, <i>dcs</i>
			IVi	J1, ORFs sottotipo7, J3, <i>dcs</i>
			IVj	J1, ORFs sottotipo8, J3, <i>dcs</i>
IV variante	J1, ORFs sottotipo3, J3,			
V	5 (C)	C2	V	J1, ORFs sottotipo1, J2, ORFs sottotipo1, J3, ORFs sottotipo1
			VT, VII	J1, ORFs sottotipo2, J2, ORFs sottotipo2, J3, SCC con <i>ccrC</i>
VI	4 (A4B4)	B	VI	J1, ORFs sottotipo1, J3, <i>dcs</i>
VII	5 (C)	C1	5C1	J1, ORFs sottotipo1, J2, ORFs sottotipo1, J3, ORFs sottotipo1
VIII	4 (A4B4)	A	VIII	J1, ORFs sottotipo1, J2, ORFs sottotipo1, J3, ORFs sottotipo1

Il contenuto delle regioni di giunzione è estremamente variabile ma è importante ricordare che in esse si possono accumulare più geni responsabili di antibiotico resistenza (tabella 8).

**Tabella 8: Altri elementi genetici presenti all'interno della cassetta SCCmec**

Elementi genetici	SCCmec tipo/sottotipo	Gene	Fenotipo di resistenza
pUB110	I,II,IVA	<i>ble/ant4'</i>	bleomicina/tobramicina
Tn554	II, SCCHg,VIII	<i>ermA/aad9/spc</i>	eritromicina/streptomicina/spectinomicina
SCCHg	-	<i>mer</i>	mercurio
pT181	III	<i>tet</i>	tetraciclina
ΨTn554	III	<i>cad</i>	cadmio
Tn4001	IV (IVc e 2B&5)	<i>aacA-aphD</i>	aminoglicosidi

## 2.2 Health Care Associated MRSA (HA-MRSA)

Dal primo isolamento del 1961 ad oggi numerosi cloni di MRSA circolano in tutto il mondo; negli anni '70 e '80 si trattava principalmente di ceppi responsabili di infezioni nosocomiali mentre negli anni '90 furono identificati i primi casi in comunità. È chiaro che nei primi decenni MRSA venne inquadrato tra i microrganismi patogeni responsabili delle infezioni nosocomiali ed indicato come Health Care Associated MRSA (HA-MRSA); col passare degli

anni tra la grande varietà dei ceppi circolanti si iniziarono a riconoscere MRSA con potenzialità epidemica (EMRSA). L'origine dei diversi ceppi MRSA circolanti non è ancora chiara ma le due teorie ad oggi formulate cercano di individuare il momento ed il contesto dell'introduzione dell' SCCmec nel genoma dello *S.aureus* e se ha avuto luogo in un unico clone o in più cloni in contemporanea. Uno dei ceppi più antichi sembra essere una variante minore dell' MRSA ST250 (ST247 MRSAl) noto col nome di clone iberico e uno dei ceppi più diffusi al mondo (16).

Ad oggi la rapida diffusione di MRSA nel contesto ospedaliero è testimoniata da tantissimi studi mirati; viene messa in evidenza l'elevata percentuale di meticillino-resistenza tra gli isolati di *S.aureus* e l'elevata mortalità ad essa associata (tabella 8) (17).

**Tabella 8: Diffusione di MRSA e mortalità associata**

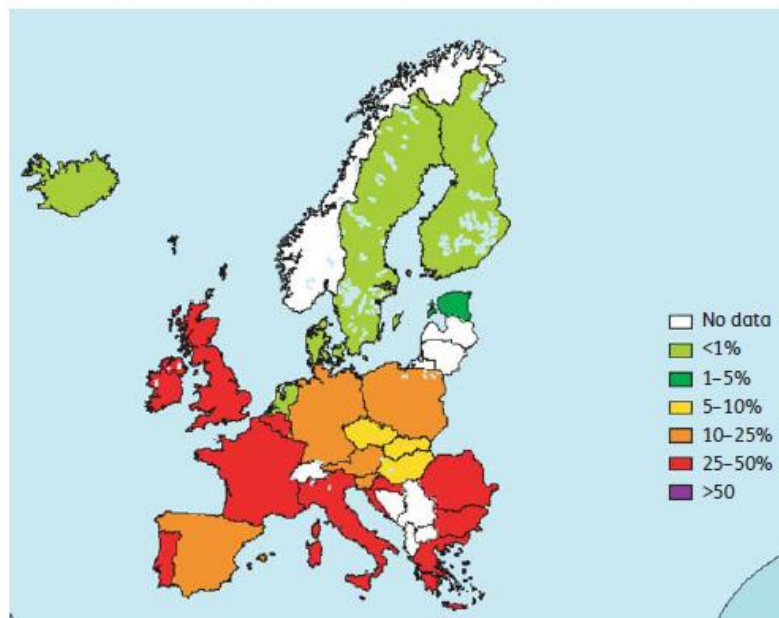
Studio	Numero di pazienti con infezione da <i>S.aureus</i> MRSA (%)	Mortalità pazienti con MRSA	Mortalità pazienti con MSSA	Odds Ratio (95% CI)
Taiwan 1990-2004	1.148 (74)	50%	28%	1.78 (1.3-2.44)
Belgio 1992-1998	85 (44.7)	64%	24%	1.93 (1.18-3.18)
UK 1995-2000	815 (46.9)	12%	5%	1.72 (0.92-3.2)
USA 1995-2003	438 (44)	34%	20%	1.8 (1.2-3.0)
USA 1996-2001	143 (38)	32%	12%	5.4 (1.5-18.7)
Francia 1997-1998	99 (30)	43%	20%	2.97 (1.12-7.88)
USA 1997-2000	348 (28)	23%	20%	1.2 (0.68-2.12)
Germania 1997-2002	378 (25.1)	17%	6%	3.84 (1.51-10.2)
UK 1997-2004	461 (50)	34%	27%	1.49 (0.99-2.26)
Brasile 2000-2001	111 (55)	55%	25%	2.52 (0.96-6.6)
Taiwan 2001-2006	215 (14)	10%	13%	0.73 (0.21-2.6)
Belgio 2002-2004	154 (43)	42%	24%	3.04 (1.15-8.04)
Germania 2002-2007	521 (13)	42%	19%	2.6 (1.4-4.9)
USA 2004-2005	68 (53)	47%	19%	5.1 (1.1-22.9)

Un grande contributo alla conoscenza del problema è dato dal sistema di sorveglianza EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) anche noto come EARSnet (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) un sistema di sorveglianza europeo nato nel 1999 e focalizzato sulla sorveglianza delle antibiotico resistenze a partire dai dati di laboratorio da casi di infezioni sistemiche/invasive. I primi dati relativi al 2002 sono espressi in percentuale indicando la proporzione di *S.aueus* resistenti alla meticillina tra gli isolati invasivi e sono molto variabili da Paese in Paese. Inoltre l'ampia visuale a livello europeo fa



notare l'esistenza di un gradiente nord-sud marcato e degno di attenzione perché paesi più mediterranei come l'Italia presentano percentuali di MRSA molto elevate (25-50%) (figura 3) (18).

**Figura 3: Percentuale di meticillino resistenza tra ceppi di *S.aureus* invasivi (EARSS 2002)**



Negli anni successivi al 2002 il report EARSS mostra un trend in discesa: soprattutto in Inghilterra si passò dal 31% del 2007 al 19.3% 2009. Rimane comunque preoccupante la situazione in molti Paesi inclusa l'Italia con percentuali di MRSA ancora maggiori del 25% (Italia nel 2011 36-41%) (19).

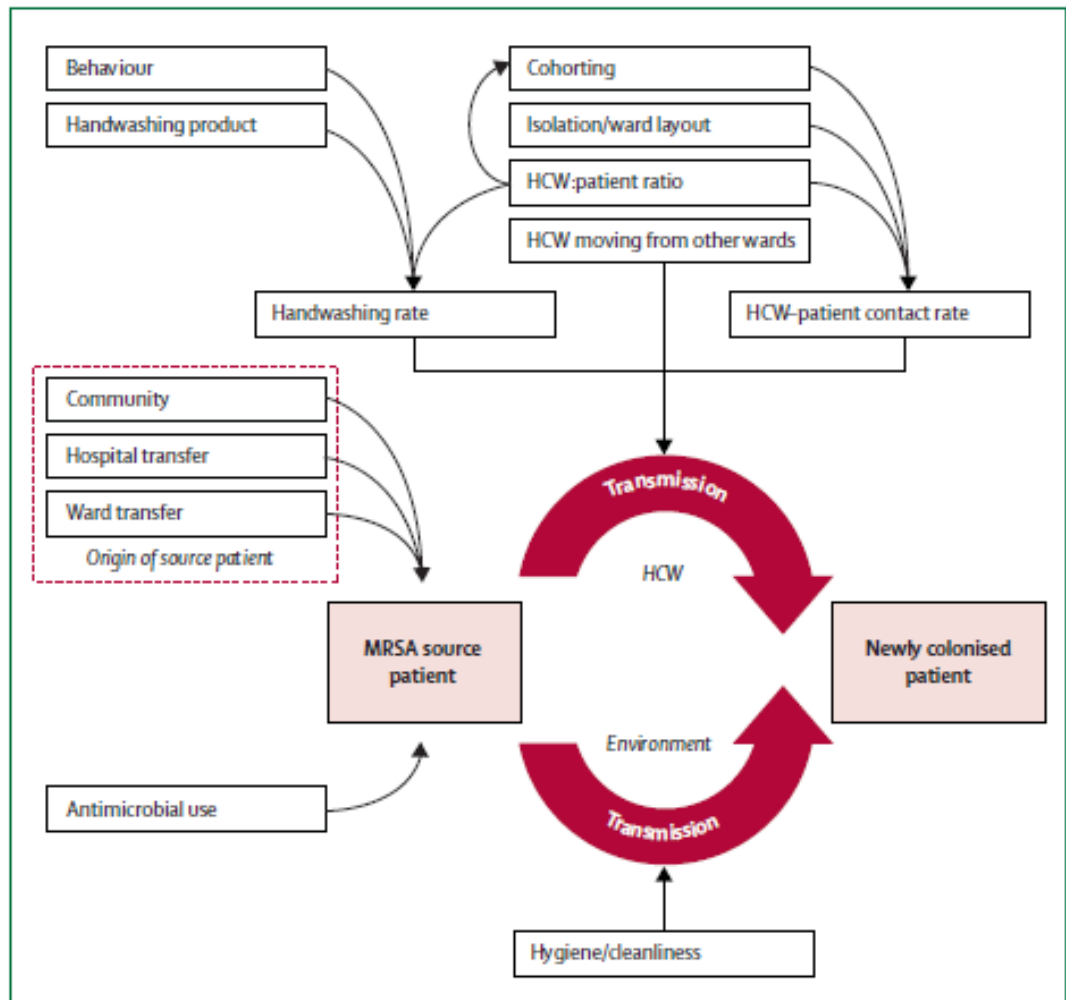
Restano al di fuori del progetto EARSS altre infezioni causate da *S.aureus* come le infezioni alla cute e ai tessuti molli (71% dei casi) e le infezioni del sito chirurgico (77% dei casi) anch'esse associate a percentuali di meticillino resistenza molto elevate, fino al 40% (18 e 20).

Un altro specifico sistema di sorveglianza europeo è stato mirato ai reparti di terapia intensiva ed è indicato col nome HELICS. Da quest'ultimo emerge che circa il 6.2% dei pazienti ricoverati in terapia intensiva sviluppano una polmonite e di questi il 17% è causato da *S.aureus* di cui il 33% MRSA (17). In USA la percentuale di MRSA nelle unità di terapia intensiva è fortemente aumentata dal 35.9% del 1992 al 64.4% del 2003 (21).

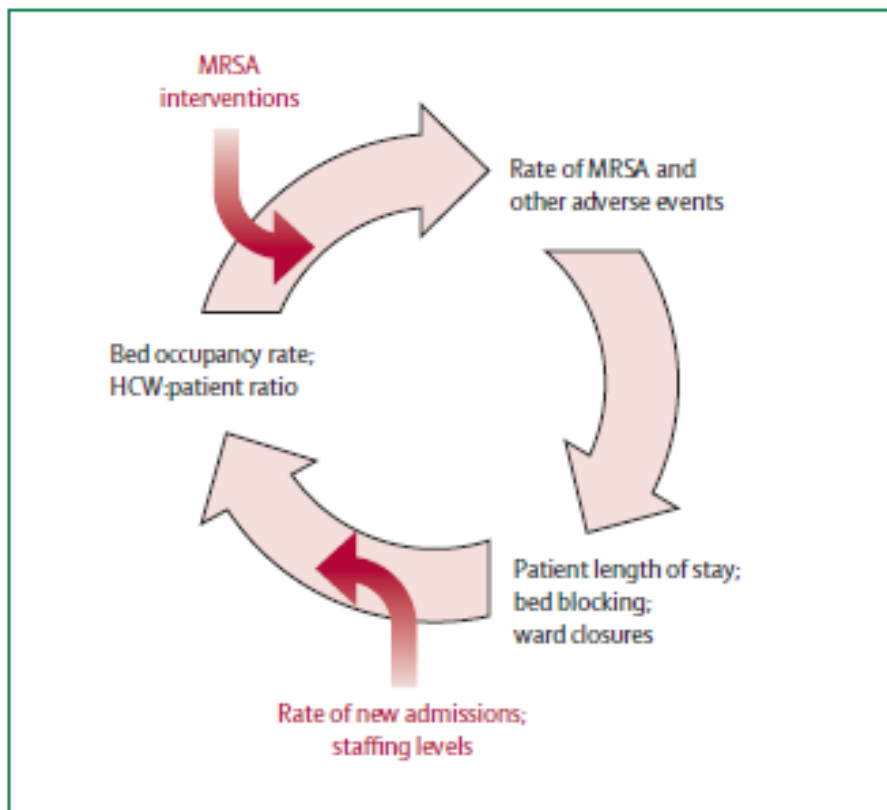
Le unità di terapia intensiva rappresentano certamente aree ad alto rischio: l'incidenza di infezioni è particolarmente elevata, sia per le condizioni di suscettibilità dei pazienti ricoverati

che per le molteplici occasioni di trasmissione attraverso pratiche assistenziali invasive. Molti fattori sono associati alla trasmissione e diffusione di MRSA in ospedale (figura 4); in particolare ulcere, ferite chirurgiche e cateteri sono i principali fattori di rischio per le infezioni da MRSA (22). Anche l'elevata frequenza delle colonizzazioni può incidere sul rischio di infezione; la colonizzazione è infatti riconosciuta come il principale fattore di rischio per lo sviluppo di infezioni da MRSA sia in ospedale che in comunità. I pazienti colonizzati fungono da serbatoio per il microrganismo e ne facilitano la circolazione all'interno del reparto; la trasmissione avviene per contatto diretto, molto spesso tramite le mani del personale medico-infermieristico. Il sovraffollamento dei reparti e la carenza di personale incidono notevolmente sul rischio e la frequenza di infezioni da MRSA instaurando un circolo vizioso che può portare ad allungare i tempi dei ricoveri e nella peggiore delle ipotesi alla chiusura del reparto (figura 5) (23).

Figura 4: Trasmissione di MRSA in ospedale



**Figura 5: Sovraffollamento del reparto e carenza di personale**



È interessante sottolineare che non tutti i ceppi di MRSA hanno avuto una buona diffusione all'interno degli ospedali. I principali HA-MRSA oggi identificati sono: CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 e ST239. Anche la loro distribuzione geografica non è omogenea; in USA cloni dominanti sono CC5-SCCmecII (USA100), CC5-SCCmecIV (USA800), CC8-SCCmecIV (USA500) e in Inghilterra CC22-SCCmecIV (EMRSA-15), CC30-SCCmecII (EMRSA-16) (24). Tutti i ceppi tendono inoltre ad evolversi ed occupare nuove nicchie ecologiche come gli stessi EMRSA-16 e EMRSA-15. Tra il 2001 e il 2007 infatti EMRSA-15 ha gradualmente rimpiazzato EMRSA-16 diventando il principale ceppo HA-MRSA circolante in Inghilterra (18). Ogni ceppo ha delle caratteristiche uniche poiché possiede un' equilibrata combinazione di geni codificanti per proteine di superficie e modulatori della risposta immunitaria (core genome). Inoltre, considerando che la maggior parte dei geni codificanti per fattori di virulenza e antibiotico resistenze si trova presso elementi mobili del genoma (MGEs) trasferiti orizzontalmente tra i batteri l'accumulo di MGEs può generare ceppi molto virulenti e multi resistenti. Tra isolati di HA-MRSA si registrano alti tassi di resistenza all'eritromicina,

tetraciclina, ciprofloxacina, clindamicina e in maniera particolarmente preoccupante alla vancomicina. Quest'ultima, la resistenza alla vancomicina, è stata acquisita dagli enterococchi per trasferimento orizzontale del gene *vanA*, inizialmente avvenuta nel ceppo HA-MRSA (USA100) denominato poi VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) e isolato per la prima volta nel 2002. Già nel 2007 la rete EARSS ha segnalato l'isolamento di 7 ceppi di sensibilità intermedia alla vancomicina (VISA), fortunatamente nessuno in Italia; VISA e VRSA comunque rappresentano un campanello d'allarme che non può essere ignorato perché al diminuire delle possibilità terapeutiche aumenta la mortalità associata alle infezioni (16e 24).

### **2.3 Community Associated MRSA (CA-MRSA)**

Infezioni MRSA nella popolazione generale in assenza di particolari fattori di rischio sono state registrate a partire dagli anni '90, in particolare in Australia nel 1993 e USA tra il 1997 e il 1999, e i ceppi isolati sono stati indicati come Community Associated MRSA in sigla CA-MRSA. Molti studi mostrano che la diffusione di CA-MRSA varia molto da Paese in Paese; i Paesi ad elevata circolazione di HA-MRSA come l'Italia sono generalmente caratterizzati da basse percentuali di CA-MRSA (1-2%) e viceversa Paesi a bassa circolazione di HA-MRSA come la Danimarca presentano elevate percentuali di CA-MRSA (29%). Indagini della CDC tra il 2001-2002 hanno valutato la percentuale di CA-MRSA tra tutti gli isolati MRSA pari all'8-20% (17 e 25). La diffusione di CA-MRSA merita costante attenzione; le infezioni sostenute da CA-MRSA infatti sono generalmente infezioni alla pelle e ai tessuti molli e raramente si hanno infezioni più gravi come la polmonite necrotizzante associata a mortalità superiore al 50%. Inoltre ad oggi non è facile identificare specifici fattori di rischio per CA-MRSA perché gli studi svolti a riguardo sono molto frammentari. Da un punto di vista microbiologico CA-MRSA e HA-MRSA sono profondamente distinti per una serie di caratteristiche:

- antibiotico resistenze perché CA-MRSA sono solitamente suscettibili alla maggior parte di antibiotici non  $\beta$ -lattamici e HA-MRSA sono invece multi resistenti,
- SCCmec di tipo IV,V o VII in CA-MRSA e I,II o III in HA-MRSA,
- leucocidina di Panton-Valentine (PVL) generalmente prodotta da CA-MRSA.

A livello globale i ceppi CA-MRSA più diffusi e frequentemente isolati sono tre: ST80, ST30 e ST8 (USA300). Il clone ST80 circolante in Europa è generalmente resistente ai fluorochinoloni, tetracicline e acido fusidico mentre in USA sono già stati identificati cloni USA300 multi resistenti (26).

In realtà l'impatto che questi CA-MRSA hanno sulla salute dell'uomo non è limitato solo alla comunità ma va esteso alle strutture assistenziali perché questi stessi ceppi possono introdursi e stabilizzarsi nel contesto ospedaliero (27). Il principale ceppo ospedaliero dei nostri giorni UK-EMRSA-15 era infatti in origine un ceppo comunitario che ha acquisito antibiotico resistenze ed è riuscito a sostituirsi all' EMRSA-16 (CC30 ST36 SCCmecII) diffondendosi negli ospedali di tutto il mondo (figura 6 e 7) (28,29 e 30).

**Figura 6: Cambiamento dei ceppi MRSA dominanti**

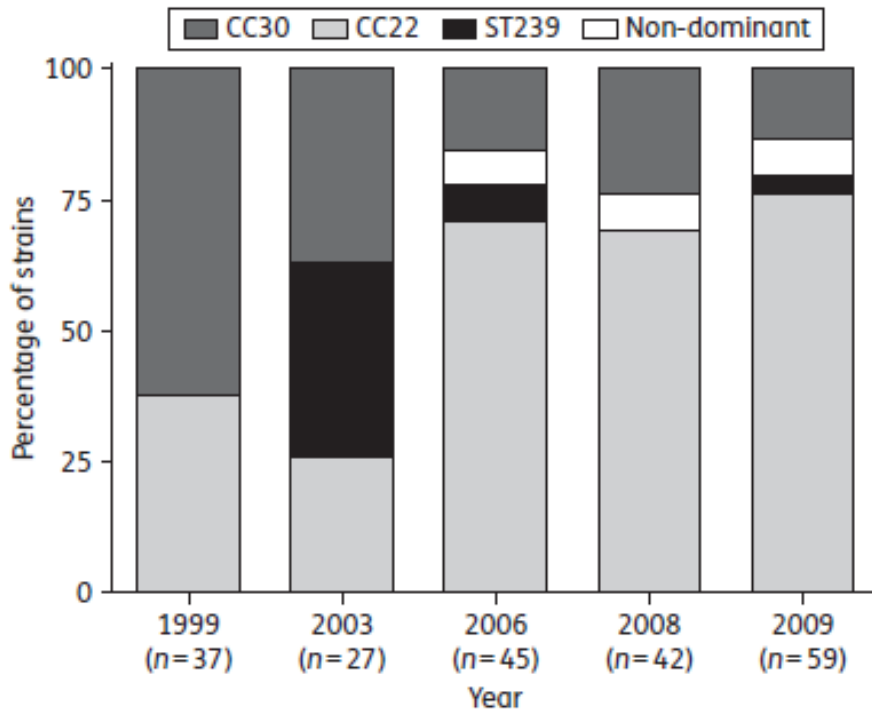
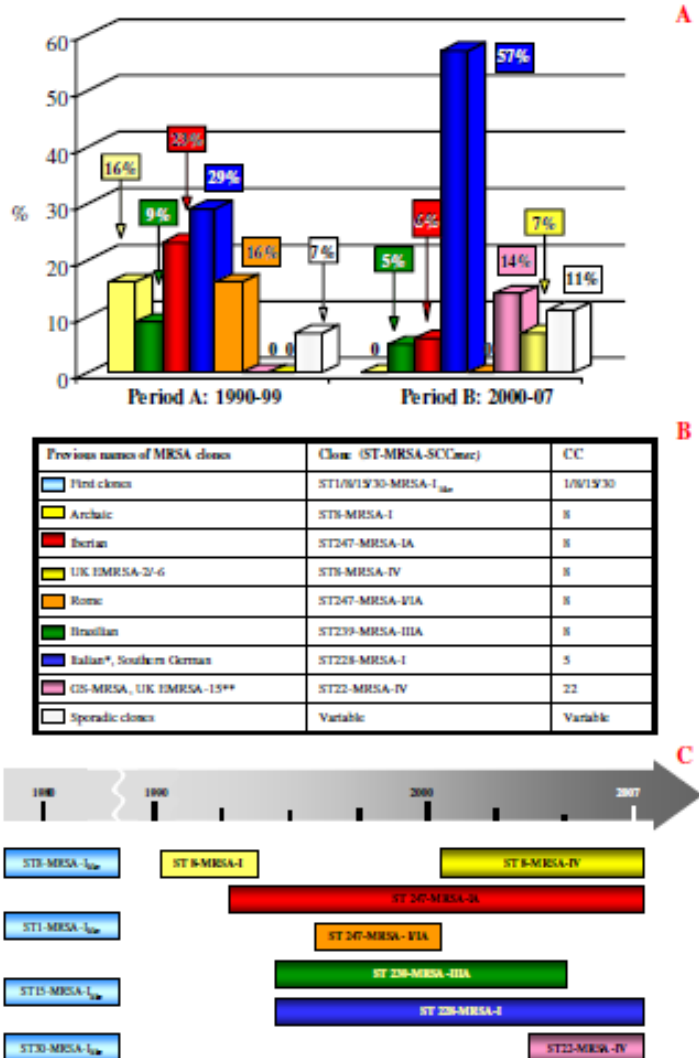


Figura 7: Cambiamento dei ceppi MRSA dominanti in Italia



## 2.4 Livestock Associated MRSA (LA-MRSA)

Di recente MRSA è stato identificato anche in casi di colonizzazione e infezione in molte specie animali ed in particolare tra gli animali di allevamento. Si tratta nello specifico di un ceppo di origine animale detto CC398 (CC sta per clonal complex) anche noto come “livestock-associated” MRSA (LA-MRSA) inizialmente identificato nei suini, nel pollame e nei vitelli allevati con sistema intensivo in Europa ed oggi emergente in molti Paesi come Belgio, Danimarca e Canada (31). I primi studi che testimoniano la possibile associazione tra la colonizzazione da MRSA nell'uomo e il contatto con gli animali da allevamento sono stati svolti in Olanda e Francia nel 2005 (32, 33). Si mette in evidenza che l'allevare o il curare animali da allevamento, come per esempio i maiali, rappresenta un fattore di rischio per la colonizzazione da MRSA; allevatori e veterinari sono categorie lavorative esposte ad un incrementato rischio rispetto alla popolazione generale. La trasmissione può avvenire non solo tramite il contatto diretto con gli animali colonizzati ma anche per via interumana considerando come fonte gli individui precedentemente colonizzati che possono mediare l'introduzione e la circolazione di questo specifico clone in comunità e nel contesto ospedaliero. Fin da questi primi studi si notò una problematica tecnica perché MRSA CC398 risulta non tipizzabile mediante digestione con *Sma I* e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), probabilmente a seguito della metilazione delle citosine nella sequenza CCCGGG riconosciuta come sito di restrizione da *Sma I* (34), quindi la tipizzazione molecolare può essere eseguita soltanto mediante *spa typing* o analisi MLST (Multi Locus Sequence Typing).



Per comprendere l'entità del problema, in numerosi studi è stata stimata la diffusione dell'MRSA negli animali, negli allevatori e nei veterinari:

- Olanda 2005 (32)      23% degli allevatori
  
- Canada 2007 (35)      33% dei suini  
                                 45% delle fattorie  
                                 20% degli allevatori
  
- Belgio 2007 (36)      44% dei suini  
                                 37% degli allevatori
  
- Olanda 2008 (37)      28% dei vitelli  
                                 33% degli allevatori  
                                 8% dei loro familiari
  
- Germania 2009 (38)    82% degli allevamenti  
                                 86% degli allevatori  
                                 4,5% dei loro familiari  
                                 45% dei veterinari  
                                 9% dei loro familiari
  
- Belgio 2011 (39)      83% dei maiali

L'elevata frequenza delle colonizzazioni da MRSA negli allevatori e veterinari (esposti al contatto diretto con gli animali) rispetto alla popolazione generale (non esposti) palesa la correlazione esistente tra l'allevare o il curare gli animali e la colonizzazione da MRSA che inoltre è confermata dai dati della tipizzazione molecolare: gli isolati dagli allevatori e veterinari coincidono con quelli animali e sono differenti da quelli circolanti nella popolazione generale (33,35,36,38,40).

La prevalenza dei portatori di MRSA è del 50% negli allevamenti colonizzati contro il 3% degli allevamenti non colonizzati (36). Il tempo stesso di contatto con gli animali rappresenta

un fattore di rischio. Gli allevatori che lavorano più ore a contatto con gli animali sono quelli che mostrano la più elevata percentuale di colonizzazione (41) anche rispetto ai veterinari (38). La trasmissione interumana viene dimostrata dall'esistenza di cluster familiari anche se la disseminazione in comunità è molto bassa (38).

La diffusione dell' MRSA CC398 nell'uomo può assumere un significato particolarmente preoccupante di seguito allo switch colonizzazione/infezione. Il primo caso di infezione nell'uomo attribuibile ad MRSA CC389 è avvenuto in Olanda nel 2004 ma il relativo studio fu pubblicato solo nel 2006 (39).

Le forme di infezione nell'uomo generalmente si manifestano con endocardite, polmonite e infezioni di ferite (40) ma ci sono stati anche alcuni casi di infezioni invasive (41, 42). Una problematica emergente è poi la diffusione di questo clone nel contesto nosocomiale. Il primo caso si verificò nel 2007 in Germania. È ormai certo che se il personale medico-infermieristico colonizzato da questo clone può trasmetterlo ai pazienti e di seguito indurne la circolazione in ospedale (43).

L'origine del CC398 è stata chiarita lo scorso anno; si è scoperto infatti che l' MRSA CC398 si è originato da un ceppo MSSA umano e che solo in un secondo momento presso gli animali da allevamento ha acquisito la resistenza alla meticillina, alla tetraciclina, allo zinco e altri metalli pesanti generalmente contenuti nei mangimi animali (44). E' chiaro che l'utilizzo massivo di antibiotici negli allevamenti intensivi, sia a scopo terapeutico che come promotori della crescita (quest'ultimo oggi vietato), per molti anni ha creato una forte pressione selettiva che ha portato all'emergenza dei microrganismi farmaco-resistenti in tale contesto. In uno studio svolto a livello europeo che include dieci Paesi, ma non l'Italia, è stato stimato l'utilizzo di antibiotici solo a scopo terapeutico sugli animali da allevamento con i dati aggiornati al 2007. Emerge immediatamente come l'utilizzo di antibiotici varia da Paese in Paese anche in maniera molto significativa dai 18 ai 188 mg/kg di biomassa. Il dato più rilevante è che questo picco viene attribuito a Paesi come Francia ed Olanda gli stessi che per primi scoprirono la presenza di LA-MRSA (45). Tutti i ceppi MRSA circolanti tra gli animali e l'uomo sono al centro dell'attenzione negli ultimi anni, così come tutti i sistemi di allevamento con alte percentuali di colonizzazioni animali da MRSA (tabella 9) (46).

**Tabella 9: Principali ceppi MRSA circolanti negli animali e nell'uomo**

Lineage	Clone*	Companion animals	Horses	Pigs	Poultry	Cattle	Humans
CC1	ST1			●		●	●
CC5	ST5 (USA100)	●		●	●	●	●
CC8	ST8 (USA500)		●				●
	ST254		●				
CC9	ST9		●	●			
CC22	ST22 (EMRSA-15)	●					●
	ST36 (EMRSA-16)	●					●
CC97	ST97			●			●
CC130	ST130					●	●
CC398	ST398*	●	●	●	●	●	●

*\*Principal ST encountered, including also single and double locus variants. The dot means present.*

Da uno studio svolto in Italia nel 2008 emerge che il 38% dei nostri allevamenti suini è risultato positivo per MRSA, sono stati identificati ben 11 differenti spa types tra cui il più comune è t899 ST398 (47).

Molto variabili sono i dati sulla contaminazione degli alimenti; la percentuale di campioni alimentari contaminati da MRSA varia tra il 2% e il 15% (48-54). In uno studio svolto in Olanda tra il 2007 e il 2008 la frequenza di MRSA nella carne è pari all'11.9% ed è diversificata per tipo di carne; inoltre dall'analisi degli spa types identificati emerge che l'85% dei ceppi MRSA isolati corrisponde al ceppo ST398 (49).

**Tabella 10: MRSA nella carne di manzo, vitello, maiale, pecora, pollo, tacchino, volatili e selvaggina**

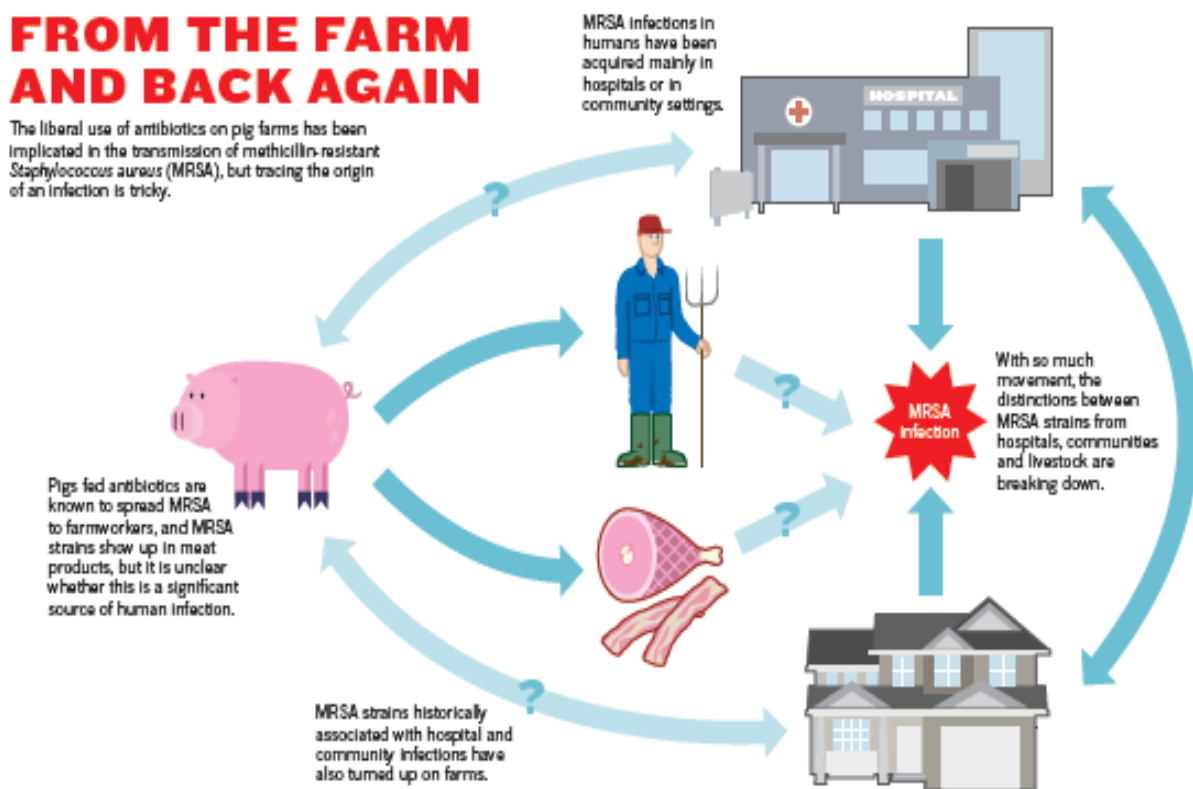
Meat type	n	Number (%) positive
Beef	395	42 (10.6)
Veal	257	39 (15.2)
Pork	309	33 (10.7)
Lamb/mutton	324	20 (6.2)
Chicken		
– Total	520	83 (16.0)
– NL+ other EU countries	302	75 (24.8)
– Import (non-EU countries)	162	2 (1.2)
– Biological	56	6 (10.7)
Turkey	116	41 (35.3)
Fowl	118	4 (3.4)
Game	178	4 (2.2)
Total	2217	264 (11.9)

**Tabella 11: Ceppi MRSA isolati nella carne di manzo, vitello, maiale, pecora, pollo, tacchino, volatili e selvaggina**

MLST/ spa type	Beef	Veal	Pork	Lamb and mutton	Chicken			Turkey	Fowl	Game	Total
					(NL+EU)	Import	Biological				
ST398											
11	18	30	20	11	51	1	3	27	2		163
34	2	2	1	1	6		1	10			23
108	3	2	8	1	2		1				17
567		3	1								4
779					1						1
899			1		1	1	1	1	1		6
1255					1						1
1451	1		1								2
1456					2						2
1457				1							1
2970	1										1
3015					1						1
3119					1						1
4208					1						1
Total	25	37	32	14	67	2	6	38	3	0	224
STnon398											
2	3	1			2			3		2	11
3									1	1	2
19				1							1
26	1		1								2
44		1									1
50	1										1
127	4										4
283	1										1
311										1	1
426					1						1
437	3										3
688				2							2
919	1										1
1430					5						5
2802	3										3
3935				1							1
Total	42	39	33	18	75	2	6	41	4	4	264
% ST398	60%	95%	97%	78%	89%	100%	100%	93%	75%	0%	85%

Il problema principale in tutti i casi di contaminazione degli alimenti è identificarne la fonte; i dati oggi a nostra disposizione sono piuttosto contrastanti (figura 8) (55). Sappiamo infatti che essa può avvenire sia ad opera di ceppi di origine umana che animale e solo la tipizzazione molecolare può svelare l'identità e origine del ceppo. Da Paese in Paese si osservano dati differenti: nel 2008 in Olanda 85% dei ceppi MRSA presenti negli alimenti è di origine animale (49) contro il 32% nello stesso anno in Canada (52) mentre tutti gli isolati della Louisiana sono di origine umana (54). È estremamente utile in questo contesto raccogliere il maggior numero possibile di isolati, confrontarli tra loro, identificarne l'origine e l'impatto sulla salute dell'uomo.

Figura 8: Circolazione di ceppi MRSA di varia origine



La trasmissione di LA-MRSA all'uomo tramite gli alimenti di origine animale non è stata ancora provata. Per fortuna le ripercussioni sulla produzione alimentare sono finora molto limitate perché anche se sono riscontrati MRSA CC398 questi sono poco virulenti e solo in bassissima percentuale (9%) portano i geni codificanti le enterotossine (56).

# OBIETTIVI

Alla luce di quanto detto e con la consapevolezza dell'entità del problema, è estremamente importante valutare l'epidemiologia locale dei ceppi MRSA e l'impatto che essi hanno sulla salute dell'uomo.

Ho cercato di raccogliere il maggior numero possibile di ceppi MRSA e MSSA da campioni di varia natura e li ho analizzati con l'obiettivo di:

- mettere in luce le differenze tra isolati MRSA di varia natura e origine,
- identificare i profili di antibiotico resistenza e virulenza più diffusi,
- confrontare tra loro i vari isolati umani,
- valutare la frequenza delle colonizzazioni nell'uomo nel contesto ospedaliero e in comunità,
- identificare i principali fattori di rischio,
- indagare la contaminazione degli alimenti e i rischi correlati alla catena alimentare,
- chiarire l'origine (umana o animale) della contaminazione degli alimenti,
- identificare i principali ceppi circolanti e valutare l'impatto dei vari ceppi sulla salute dell'uomo,
- indagare la correlazione tra ceppi MRSA e MSSA circolanti,
- comprendere a fondo l'epidemiologia locale i cambiamenti e l'evoluzione dei ceppi isolati e infine realizzare interventi di prevenzione e controllo mirati (57,58).

È stato inoltre necessario confrontare le tecniche di tipizzazione molecolare esistenti valutandone punti di forza e debolezza per un uso razionale e consapevole (59).

# MATERIALI E METODI

## Campioni biologici esaminati

In tre anni di attività di ricerca sono stati raccolti e analizzati campioni biologici di varia natura:

- 145 campioni di alimenti di origine animale (tabella 12);
- 71 campioni animali (tabella 13),
- 500 tamponi nasali da bambini di età inferiore ai sei anni reclutati in comunità presso 26 asili nido comunali di Palermo (tabella 14),
- 2452 tamponi nasali da neonati ricoverati presso l' UTIN del Policlinico "P. Giaccone" di Palermo (tabella 15).

**Tabella 12: Campioni alimentari**

Campioni alimentari	Numero
Totali 145	
Formaggi	82
Yogurt e creme dolci	5
Latte	12
Carne	23
Wurstel	4
Salumi	19

**Tabella 13: Campioni animali**

Campioni animali di varia natura	Numero
Latte ovino e bovino	44
Tampone gatto	1
Altro tampone	1
Polmone ratto	1
Polmone cane	2
Altro polmone	1
Croste ovino	1
Croste	6
Crosta e peli	1
Tampone auricolare cane	2
Tampone auricolare	2
Sangue	1
Cuore	1
Tampone uretrale cane	1
Placenta	2
Milza volpe	1
Urina volpe	1
Tampone cutaneo	1
Cervello	1
<b>TOTALE</b>	<b>71</b>

**Tabella 14: Tamponi nasali da bambini di età inferiore ai sei anni reclutati in comunità presso gli asili nido comunali di Palermo**

Raccolta tamponi nasali presso gli asili nido di Palermo	Numero (%)
Asili	26
Capienza totale	988
Consensi informati	617 (62,4%)
Tamponi nasali eseguiti	500 (50,6%)



**Tabella 15: Tamponi nasali da neonati ricoverati presso l' UTIN del Policlinico "P. Giaccone" di Palermo**

Anno dello studio	Numero tamponi nasali raccolti	Numero neonati inclusi nello studio
2009/2010	605	251
2010/2011	613	245
2011/2012	640	237
2012/2013	594	244
totale	2452	977

I campioni di alimenti di origine animale analizzati sono tutti alimenti venduti al dettaglio a Palermo e come tali consentono di identificare il rischio correlato alla catena alimentare.

I campioni animali di varia natura inclusi nello studio sono isolati animali e precedentemente identificati come stafilococchi.

I tamponi nasali svolti nei bambini reclutati in comunità ed in UTIN consentono di valutare la circolazione di ceppi MRSA e la frequenza delle colonizzazioni in comunità e nel contesto ospedaliero. Lo studio svolto negli asili comunali di Palermo nel 2013 ha consentito di raccogliere una notevole quantità di dati sulle dinamiche di circolazione in comunità. Sono stati raccolti 617 consensi informati da parte dei genitori e 500 tamponi nasali dai bambini; tutti i bambini, in presenza del consenso informato dei genitori, da cui è stato possibile ottenere un tampone nasale sono inclusi nello studio. È importante ricordare che tutti i bambini che frequentano gli asili inclusi nello studio sono di età inferiore ai 3 anni. Naturalmente il numero dei tamponi raccolti è inferiore al numero dei consensi informati raccolti perché alcuni tamponi non sono stati eseguiti per assenza dei bambini o loro mancata collaborazione.

Il programma di sorveglianza delle colonizzazioni da MRSA tra i neonati ricoverati in UTIN, già iniziato nel 2009, consente di identificare specifici fattori di rischio correlati all'ambiente ospedaliero. Vengono reclutati tutti i neonati ricoverati in UTIN, in nessun caso la presenza di una terapia antimicrobica, le condizioni cliniche o il motivo del ricovero, peso, segni clinici, o sospetto di sepsi, hanno impedito il reclutamento del neonato.

Per tutti i pazienti UTIN è stato applicato il seguente protocollo :

- prelievo del campione di sorveglianza tramite tampone nasale eseguito entro 24 ore dell'ammissione;
- il tampone viene ri-eseguito alla dimissione, nel caso in cui l'intervallo di tempo tra ricovero e dimissione superi le 72 ore;
- un ulteriore tampone nasale viene prelevato a cadenza settimanale, se la degenza supererà i sette giorni.

Per ogni neonato reclutato nello studio è stata compilata una cartella informatizzata contenente:

- dati anamnestici: nome e cognome, codice, sesso, luogo di nascita con indicazione del nosocomio se outborn, settimana gestazionale, peso alla nascita, modalità del parto.
- dati attinenti il singolo campionamento: data dell'esecuzione del tampone, presenza di terapia antimicrobica, principio attivo e numero di giorni, scopo: profilassi o terapia, e quest'ultima se empirica o basata sull'identificazione del microrganismo con o senza antibiogramma; presenza di segni clinico/laboratoristici di sepsi (globuli bianchi e PCR se eseguiti nelle 24 ore precedenti o successive il campionamento).
- dati sul decorso clinico del neonato: giorni di degenza, giorni di alimentazione parenterale ed enterale con possibilità di specificare se con latte materno o formula, esecuzione di particolari procedure invasive e loro durata (posizionamento tubo endotracheale per ventilazione assistita, reperimento di cateteri venosi centrali ombelicali o percutanei per nutrizione parenterale, utilizzazione di accesso venoso periferico).

# Procedure microbiologiche

## Isolamento

Nel caso dei campioni alimentari viene realizzata una sospensione in acqua peptonata (1:10) e i campioni di natura solida vengono trattati allo stomacher. La composizione del peptone salino è la seguente: peptone 1g; cloruro di sodio 8.5g; acqua 1L con un Ph finale di 7.0 +/- 0.1 a 25°C.

Per il latte si effettua semplicemente la diluizione 1/10 con il peptone salino e si agita manualmente velocemente per qualche secondo

Per tutti i campioni si procede :

- fase di arricchimento in BHI (Brain-Heart-Infusion) con incubazione a 37 °C per 24 ore.

La composizione del brodo BHI è espressa in g/l ed è costituito da: infuso solido di cervello di vitello (12.5), infuso solido di cuore di manzo (5), proteasi peptone (10), glucosio (2), NaCl (5), Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.5).

- semina per dissociazione del brodo in piastre contenenti “Sale-Mannite-Agar” (SMA). Si pone ad incubare a 37 °C per 48 ore.

Il terreno ha una caratteristica composizione (g/l): proteasi peptone (10),mannitolo (10), NaCl (75), rosso-fenolo (0.025),agar (15) e con l’aggiunta di tuorlo d’uovo contenente lecitina. Si presenta di colorazione rossastra conferita dal colorante all’interno : il rosso fenolo. È un terreno selettivo per la maggior parte dei batteri in quanto possiede percentuali di cloruro di sodio molto elevate inoltre il mannitolo è sia un composto energetico , sia un agente differenziale : la fermentazione del mannitolo da parte dei batteri provoca un’acidificazione del terreno con conseguente viraggio di colore dal rosso al giallo (ad opera del rosso fenolo che funge da indicatore di PH ). Le colonie di *S.aureus* sono inoltre facilmente identificate per il pigmento giallo-oro prodotto e l’alone opaco intorno (per intervento dell’enzima lectinasi).

- se si osserva crescita e le colonie presentano un pigmento giallo oro con alone opaco attorno (tipiche caratteristiche fenotipiche delle colonie di *S. aureus*), si passa alle indagini successive.

- valutazione della sensibilità alla meticillina mediante allestimento di una subcoltura, del microrganismo identificato, in piastre di “Mueller Hinton agar con l’aggiunta di oxacillina (6 µg/ml) ” . Si pone ad incubare a 37°C per 24 ore;
- per gli MRSA si va a valutare, con il metodo della diffusione in agar (metodica di Kirby-Bauer) la sensibilità agli antibiotici: vancomicina 30 µg (VA), teicoplanina 30 µg (TEC), ceftriaxone 30 µg (CRO), cefepime 30 µg (FEP), claritromicina 15 µg (CLR), imipenem 10 µg (IPM), piperacillina/tazobactam 85 µg (TZP), cotrimoxazolo 25 µg (SXT), ciprofloxacina 5 µg (CIP), levofloxacina 5 µg (LEV), linezolid 30 µg (LZD), gentamicina 10 µg (CN), tetraciclina 10 µg (TE), rifampicina 30 µg (RD), clindamicina 2 µg (DA), eritromicina 5 µg (E), cefoxitina 30 µg (FOX) in Mueller Hinton agar. Il tutto va in termostato a 37°C per 24 ore. Il Mueller Hinton Agar è generalmente utilizzato per testare la sensibilità agli antibiotici. Ha PH finale  $7.3 \pm 0.2$  e composizione (g/l): agar (15), caseina (17.5), amido (1.5), infuso di carne (300). La tabella 16 mostra i valori soglia per ciascun antibiotico utilizzati nella lettura ed interpretazione dell’ antibiogramma.

Tabella16: Valori soglia per la lettura e l'interpretazione dell' antibiogramma

<i>ANTIBIOTICO</i>	<i>Resistente</i>	<i>Intermedio</i>	<i>Sensibile</i>
VA (vancomicina) 30 µg	≤ 9	10-11	≥ 12
TEC (teicoplanina) 30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14
CRO (ceftriaxone) 30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
FEP (cefepime) 30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
CLR (claritromicina) 15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
IPM (imipenem) 10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16
TZP (piperacillina/tazobactam) 85 µg	≤ 17	-	≥ 18
SXT (cotrimoxazolo) 25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
CIP (ciprofloxacina) 5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
LEV (levofloxacina) 5 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
LZD (linezolid) 30 µg	≤ 4	-	≥ 4
CN (gentamicina) 10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
TE (tetraciclina) 10 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
RD (rifampicina) 30 µg	≤ 16	17-19	≥ 20
DA (clindamicina) 2 µg	≤ 14	15-20	≥ 21
E (eritromicina) 5 µg	≤ 13	14-22	≥ 23
FOX (cefoxitina) 30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18

Infine tutti i ceppi MRSA e MSSA isolati sono conservati per infissione in fialette con Brodo Triptosio e Agar e si pone in incubazione a 37° C per 24 h. La conservazione dei ceppi, **ceppoteca**, è indispensabile ai fini epidemiologici.

## Tipizzazione molecolare

Per fortuna ad oggi esistono numerose tecniche di tipizzazione molecolare mirate all'identificazione e classificazione dello *Staphylococcus aureus*; naturalmente ogni metodo, se applicato separatamente dagli altri, ha un'utilità ed una capacità discriminativa differente. Microbiologi e clinici devono cercare di integrare tutte le tecniche a disposizione per raccogliere la maggior quantità di informazioni possibile come: l'epidemiologia di infezioni e colonizzazioni, la distinzione tra gli outbreaks, l'identificazione di nuove infezioni e infezioni ricorrenti.

Prima di selezionare una tecnica di tipizzazione è importante valutarne le caratteristiche secondo due criteri fondamentali: efficacia ed efficienza. Tra le caratteristiche di efficacia ricordiamo l'univoca identificazione e nomenclatura, la riproducibilità, il potere discriminativo e la correlazione con altre tecniche di tipizzazione. Mentre tra le caratteristiche di efficienza abbiamo la versatilità, la rapidità, la facilità di esecuzione ed interpretazione (59).

In teoria le caratteristiche di una tecnica di tipizzazione ideale (ma non reale) dovrebbero essere le seguenti:

- non ambiguità, alta riproducibilità e dati facilmente interpretabili,
- comparabilità tra laboratori differenti,
- standardizzazione internazionale del metodo e della nomenclatura adottata,
- rapidità e basso costo,
- versatilità.

Nessuna tecnica realmente esistente rispecchia tutti i parametri ideali citati ma è chiaro che buoni obiettivi possono essere tramite l'integrazione di varie tecniche e la standardizzazione dei vari metodi e nomenclature (tabella 17). Si tratta di un approccio integrato definito come "multi-typing approach" e suggerito dall' European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) già nel 2010 (58).

Andrò ad illustrare le tecniche di tipizzazione molecolare utilizzate nella mia attività di ricerca seguendo lo stesso ordine con cui esse sono state eseguite per chiarire come ciascuna tecnica è stata utilizzata con un obiettivo preciso, in maniera razionalizzata e valutando il rapporto costo beneficio.

Tabella 17: Principali tecniche di tipizzazione molecolare esistenti e loro caratteristiche

**Table 3**  
Features of the most frequently used typing methods for *Staphylococcus aureus*.

Method	Genetic targets	Features
<i>spa</i> sequence typing	Sequence polymorphism in the variable X region of the <i>spa</i> gene for <i>S. aureus</i> surface protein A	Strengths: rapid, high throughput, portability, dynamically evolving, standard nomenclature Weaknesses: misclassification of a small number of lineages Strengths: defines core genetic population, portability, standard nomenclature Weaknesses: low throughput, high cost
Multilocus sequence typing (MLST)	Core genetic population [core and core variable (CV) genes]	Strengths: standard nomenclature Weaknesses: low throughput, high cost, no standard protocol, evolving nomenclature
SCCmec typing	MGEs	Strengths: high discriminatory index Weaknesses: technically difficult, slow, limited portability, multiple nomenclature, misclassification of some lineages
Macrorestriction pattern analysis (PFGE)	Restriction polymorphism of the whole chromosome	Strengths: rapid, high throughput Weaknesses: no international standard protocol or nomenclature, misclassification of some lineages
Multilocus VNTR analysis (MLVA)	Polymorphism in chromosomal VNTR elements	Strengths: rapid, high throughput Weaknesses: no international standard protocol or nomenclature, misclassification of some lineages

Adapted from [80].

SCCmec, staphylococcal cassette chromosome mec; MGE, mobile genetic element; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; VNTR, variable-number tandem repeat.

# MLVA

La MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polimorphism) è una metodologia, basata sulla PCR Multiplex, utile per la tipizzazione di molte specie batteriche. Si va ad indagare il numero delle unità ripetute all'interno dello stesso locus e nello specifico per lo *Staphylococcus aureus* vengono indagati cinque loci VNTR: *sdr*, *clfA*, *clfB*, *spp*, *spa* (61).

Si procede alla realizzazione di una brodo coltura e di seguito all'estrazione del DNA con il seguente protocollo:

- si preleva il ceppo dalla fialetta di conservazione con un'ansa e si semina per dissociazione in Mueller Hinton agar, incubando a 37 °C per 24 h;
- ottenuta la crescita, si allestisce una brodocoltura sospendendo in 5 ml di BHI e incubando a 37 °C per 24 h.
- centrifugare 1 ml BHI brodocoltura a 13000 rpm per 5 min \*
- risospendere al vortex il pellet in 50 µl di TE (10/1 mM) # e trasferire in provette da 0,5 ml
- bollire per 5 min (thermal cycler: BOIL) §
- aggiungere 10 µl di lysostaphin (0,6 mg/ml in H<sub>2</sub>O distillata) §
- quindici min in ghiaccio (secondo il protocollo originale a 37 °C)
- aggiungere 20 µl di PK (0,5 mg/ml in tris 50 mM pH 8.0) §
- 55 °C per 10 min – 95 °C per 15 min (termal cycler: PKLY) §
- Addizionare 20 µl di RNAsi (0,5 mg/ml in H<sub>2</sub>O distillata) ☒ §
- 37 °C per 15 min (termal cycler 37-15) conservare a -20 °C

*\* versare il surnatante velocemente, centrifugare per qualche sec, aspirare il surnatante residuo con il puntale*

*# Frigo*

*§ Centrifugare a 8000 rpm per qualche sec e risospendere al vortex*

*☒ Provette da 0,5 RNAsi 5 mg/ml, provette da 1,5 0,5 mg/ml*



Si prepara la miscela di reazione (tabella 18e 19) e si procede al programma di amplificazione all'interno del termociclatore (tabella 20).

**Tabella 18: Miscela di reazione**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE I	CONCENTRAZIONE F	VOLUME UNITARIO
Buffer	5 x	1 x	10 µl
dNTPs	2 mM	0,2 mM	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	3 µl
Primer mix	clf B, spa, ssp: 5 µM clf A, sdr: 10 µM	clf B, spa, ssp: 0,5 µl clf A, sdr: 1 µl	5 µl
Taq Polimerasi		1 U	0,2 µl
DNA			1 µl
Acqua distillata sterile			25,8 µl
Totale			50 µl

**Tabella 19: Primers utilizzati**

Marker locus	Primer designation	Primer sequence
<i>clfA</i>	ClfA-F ClfA-R	5'-GATTCTGACCCAGGTTTCAGA 5'-CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT
<i>clfB</i>	ClfB-F ClfB-R	5'-ATGGTGATTGAGCAGTAAATCC 5'-CATTATTTGGTGGTGTAACCTTT
<i>sdr</i>	SdrCDE-F SdrCDE-R	5'-GTAACAATTACGGATCATGATG 5'-TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT
<i>spa</i>	Spa-F Spa-R	5'-AGCACCAAAAGAGGAAGACAA 5'-GTTTAACGACATGTACTCCGT
<i>ssp</i>	SspA-F SspA-R	5'-ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA 5'-TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC

**Tabella 20: Programma di amplificazione**

PREDENATURAZIONE	AMPLIFICAZIONE PCR	ESTENSIONE FINALE
1 ciclo di 94 °C per 5 min	20 cicli di Denaturazione 94 °C per 30 sec Annealing 55 °C per 30 sec Estensione 72 °C per 1 min	1 ciclo di 72 C per 7 min

Di seguito 10 µl di ogni campione amplificato e 5 µl di 100 pb DNA ladder colorato vengono caricati su gel d'agarosio al 2% in TBE 0,5x + etidio bromuro 1% e fatti migrare in tampone TBE 0,5x a 100 V per 2 ore. Le bande di DNA ottenute da ciascun campione vengono visualizzate su un transilluminatore a raggi UV, fotografate e scannerizzate. I pattern vengono confrontati e analizzati usando uno specifico software che riesce a distinguere i differenti ceppi e di seguito indica la correlazione epidemiologica esistente tra essi.

## SCCmec typing

La determinazione delle cassette SCCmec presenti viene effettuata secondo un protocollo di PCR Multiplex (62). In tabella sono illustrati i primers utilizzati, la miscela di reazione e il programma di amplificazione (tabella 21, 22 e 23).

**Tabella 21: Primers utilizzati**

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Primer specificity (SCCmec type, region)	Amplicon size (bp)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTACCACAAGGACTACCAGC	I, J1 region	495
ccrC F2 ccrC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	V, <i>ccr</i> complex	449
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG ATGGAGATGAATTACAAGGG	III, J3 region	414
SCCmec V J1 F SCCmec V J1 R	TTCTCCATTCTGTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	V, J1 region	377
des F2 des R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	I, II, IV, and VI, J3 region	342
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	II and IV, <i>ccr</i> complex	311
kdp F1 kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	II, J1 region	284
SCCmec III J1 F SCCmec III J1 R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	III, J1 region	243
mecl P2 mecl P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	II and III, <i>mecl</i> complex	209
mecA P4 mecA P7	TCCAGATTACAACCTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	Internal positive control	162

**Tabella 22: Miscela di reazione**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE FINALE
Buffer	1 x
dNTPs	0,12 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Primers	kdp 0,2 µM CIF2, RIF5, SCCmec III, SCCmec V 0,4 µM mecl, des, mecA, ccrB2, ccrC 0.8 µM
Taq Polimerasi	1.25 U
DNA	5ng
	Volume finale di 50µl

**Tabella 23: Programma di amplificazione**

PREDENATURAZIONE	AMPLIFICAZIONE PCR	ESTENSIONE FINALE
1 ciclo di 94°C per 4 min	30 cicli di Denaturazione 94°C per 30 sec Annealing 53°C per 30 sec Estensione 72°C per 1 min	1 ciclo di 72 °C per 4 min

I prodotti dell'amplificazione vengono visualizzati mediante elettroforesi su gel.

## MLST

Se vengono identificati ceppi differenti mediante MLVA questi vengono generalmente indirizzati ad analisi più approfondita mediante MLST (MultiLocus Sequence Typing). L'obiettivo principale è distinguere i ceppi dominanti e molto comuni dai ceppi sporadici nonché assegnargli un'identità univoca riferita ad una nomenclatura standardizzata a livello internazionale (59 e 62). La metodica MLST si basa sull'amplificazione ed il sequenziamento di sette geni costitutivi in particolare nel caso dello *Staphylococcus aureus* i geni codificanti per: la carbammato chinasi (*arcC*), la shikimato deidrogenasi (*aroE*), la glicerolo chinasi (*glpF*), la guanilato chinasi (*gmk*), la fosfato acetiltransferasi (*pta*), trioso fosfato isomerasi (*tpi*) e l'acetil coenzimaA acetiltransferasi (*yqiL*) (tabella 24 e 25). All'interno di ciascun gene si va a focalizzare l'attenzione su una regione interna di circa 450bp che viene sequenziata e di seguito tutte le possibili diverse sequenze sono identificate come una varianti alleliche. L'intero profilo allelico nato dalla combinazione degli alleli dei sette geni osservati rende possibile l'identificazione univoca del sequence type (ST) (<http://www.mlst.net>) (64).

**Tabella 24: Primers utilizzati**

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
Carbamate kinase ( <i>arcC</i> )	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase ( <i>aroE</i> )	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTGATTAATAACGATATC
Glycerol kinase ( <i>glpF</i> )	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase ( <i>gmk</i> )	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase ( <i>pta</i> )	<i>pta</i> -Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase ( <i>tpi</i> )	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase ( <i>yqiL</i> )	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

**Tabella 25: Geni di interesse**

Gene	Sequence length (bp)	No. of alleles	No. of polymorphic sites
<i>arcC</i>	456	17	19
<i>aroE</i>	456	17	23
<i>glpF</i>	465	11	14
<i>gmk</i>	429	11	13
<i>pta</i>	474	15	18
<i>tpi</i>	402	14	18
<i>yqiL</i>	516	16	19

La miscela di reazione e il programma di amplificazione sono mostrate nella tabella 26 e 27.

**Tabella 26: Miscela di reazione**

COMPONENTE	QUANTITA'
primer	0.5µg ciascuno
<i>Taq</i>	1 U
buffer	10x 5µl
dNTPs	0.2mM
DNA	0.5µg
Volume di reazione totale	50 µl

**Tabella 27: Programma di amplificazione**

DENATURAZIONE INIZIALE	CICLI AMPLIFICAZIONE	DI ESTENSIONE FINALE
95°C 5 min	30 cicli: 55°C 1 min 72°C 1 min 95°C 1 min	72°C 5 min

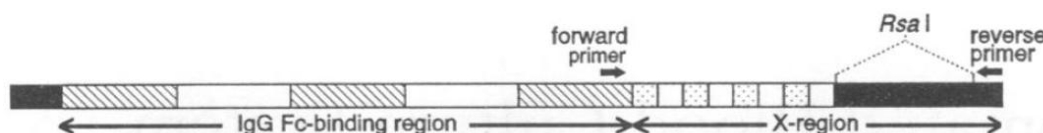
## ***Spa* typing**

La metodica dello *spa* typing si basa sull'analisi della regione polimorfica *X*, anche nota come SSR (short sequence repeat), all'interno del gene *spa* codificante per la proteina di superficie A. In particolare sono state identificate piccole unità ripetitive di circa 24bp alla base della diversità dei ceppi; la variabilità della regione *X* si deve a delezioni e duplicazioni delle unità ripetitive e inoltre a mutazioni puntiformi per cui è stato elaborato un metodo di amplificazione e successivo equenziamento mirato (65 e 66). La sequenza ottenuta viene confrontata per allineamento mediante specifici software con la sequenza di riferimento e alla fine viene identificata con un codice numerico indicativo della regione SSR.

Il gene *spa* è composto da circa 2150bp ed è organizzato in varie regioni: una regione di legame alla porzione Fc delle immunoglobuline, la regione *X* e la regione C-terminale per il

legame alla parete cellulare (figura 9). La regione X analizzata viene in un primo momento amplificata; i prodotti dell'amplificazione vengono ridotti in frammenti più piccoli tramite l'enzima di restrizione *RsaI* in modo da identificare variazioni nel numero di unità ripetitive quindi esclusivamente i polimorfismi di lunghezza. Per identificare le mutazioni puntiformi presenti gli stessi prodotti dell'amplificazione vengono utilizzati per il sequenziamento (67).

**Figura 9: Struttura gene *spa***



**Tabella 28: Miscela di reazione**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE I	CONCENTRAZIONE F	VOLUME UNITARIO
Buffer	5 x	1 x	5 µl
dNTPs	2mM	350µM	4,375 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2 mM	2 µl
Spa 1113f e Spa 1154r	100µM	0.5µM	2.5 µl 2.5 µl
Taq Polimerasi	5U/µl	2.5	0,5 µl
DNA			1 µl
Acqua distillata sterile			7,125 µl
Totale			25 µl

**Tabella 29: Programma di amplificazione**

DENATURAZIONE INIZIALE	CICLI DI AMPLIFICAZIONE	ESTENSIONE FINALE
95°C 10 min	30 cicli: 95°C 30s 60°C 30s 72°C 45s	72°C 10 min

## Indagini aggiuntive

In parallelo all'applicazione di queste metodiche di tipizzazione molecolare sono state svolte anche delle semplici amplificazioni di geni di virulenza per avere una visione completa delle caratteristiche dei ceppi. In particolare nel nostro caso il gene *tst-1* (toxic shock syndrome toxin-1) e *pvl* (panton valentine leukocidin) (68).

**Tabella 30: Amplificazione *tst-1***

Amplificazione <i>tst</i>	
Miscela di reazione	
PCR buffer 10x	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l
Tst up	2 $\mu$ l
Tst down	2 $\mu$ l
Taq polimerasi	0,2 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	31,8 $\mu$ l
Volume totale	50 $\mu$ l
Programma di amplificazione	
94°C 10s	
25 cicli:	
94°C 30s	
50°C 30s	
72°C 60s	
72°C 7min	



**Tabella 31: Amplificazione pvl**

Amplificazione pvl	
Miscela di reazione	
PCR buffer 10x	10µl
MgCl <sub>2</sub>	3µl
dNTPs	5µl
Pv1	2µl
Pv2	2µl
Taq polimerasi	0,2µl
DNA	1µl
H <sub>2</sub> O	26,8µl
Volume totale	50µl
Programma di amplificazione	
95°C 5min	
25 cicli:	
94°C 60s	
57°C 30s	
72°C 60s	
72°C 7min	

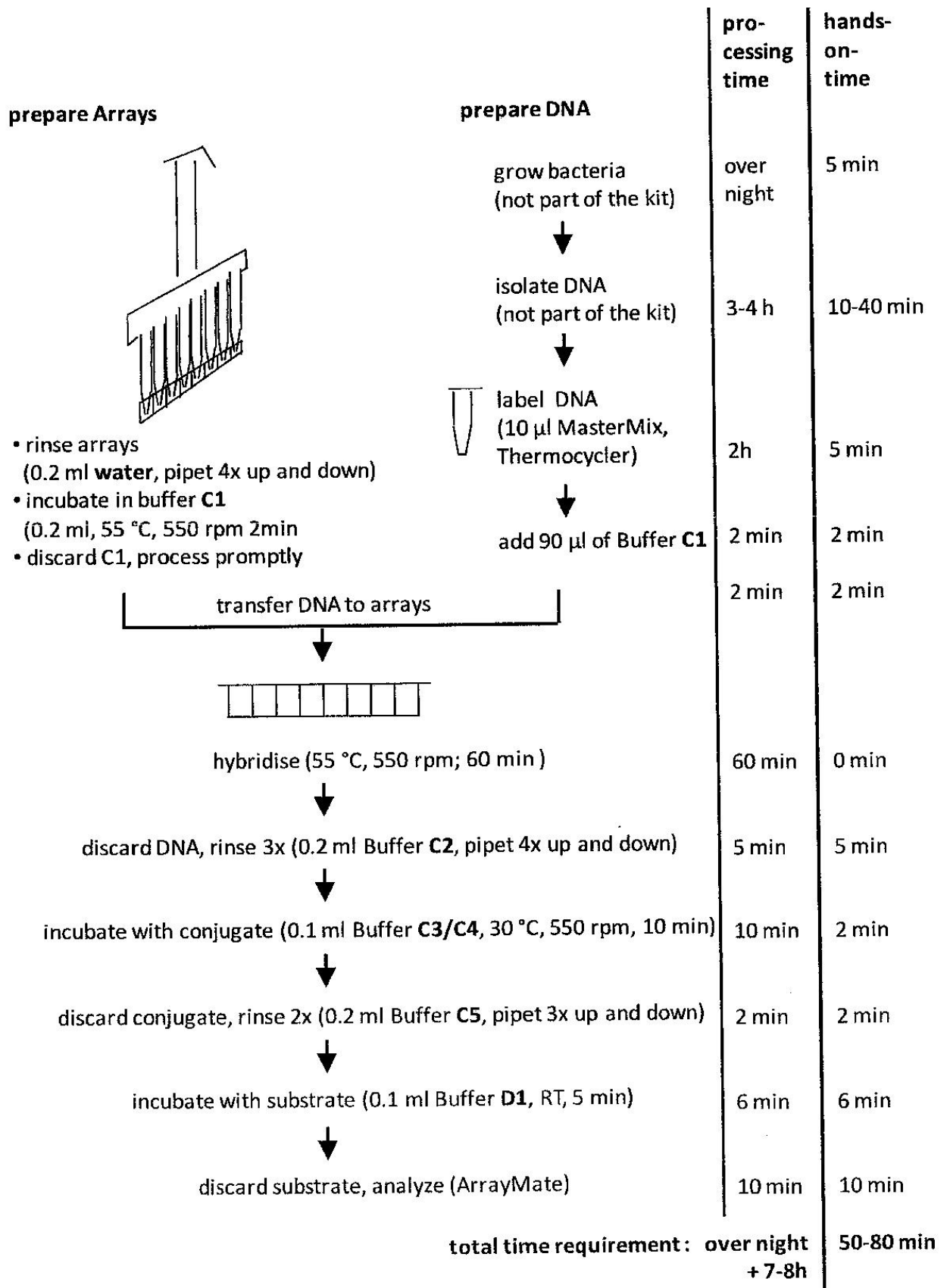
I prodotti dell'amplificazione, rispettivamente 548bp per *tst* e 433bp per *pvl*, vengono visualizzati mediante elettroforesi su gel (agar 1,5%, TBE 0,5X, 100V, 1:30h).

## Microarray e sequenziamento

Di recente l'introduzione di metodi come il microarray e il sequenziamento ha portato a grandi passi avanti nella prevenzione e nel controllo delle infezioni da *Staphylococcus aureus* (69, 70, 71, 72, 73,74).

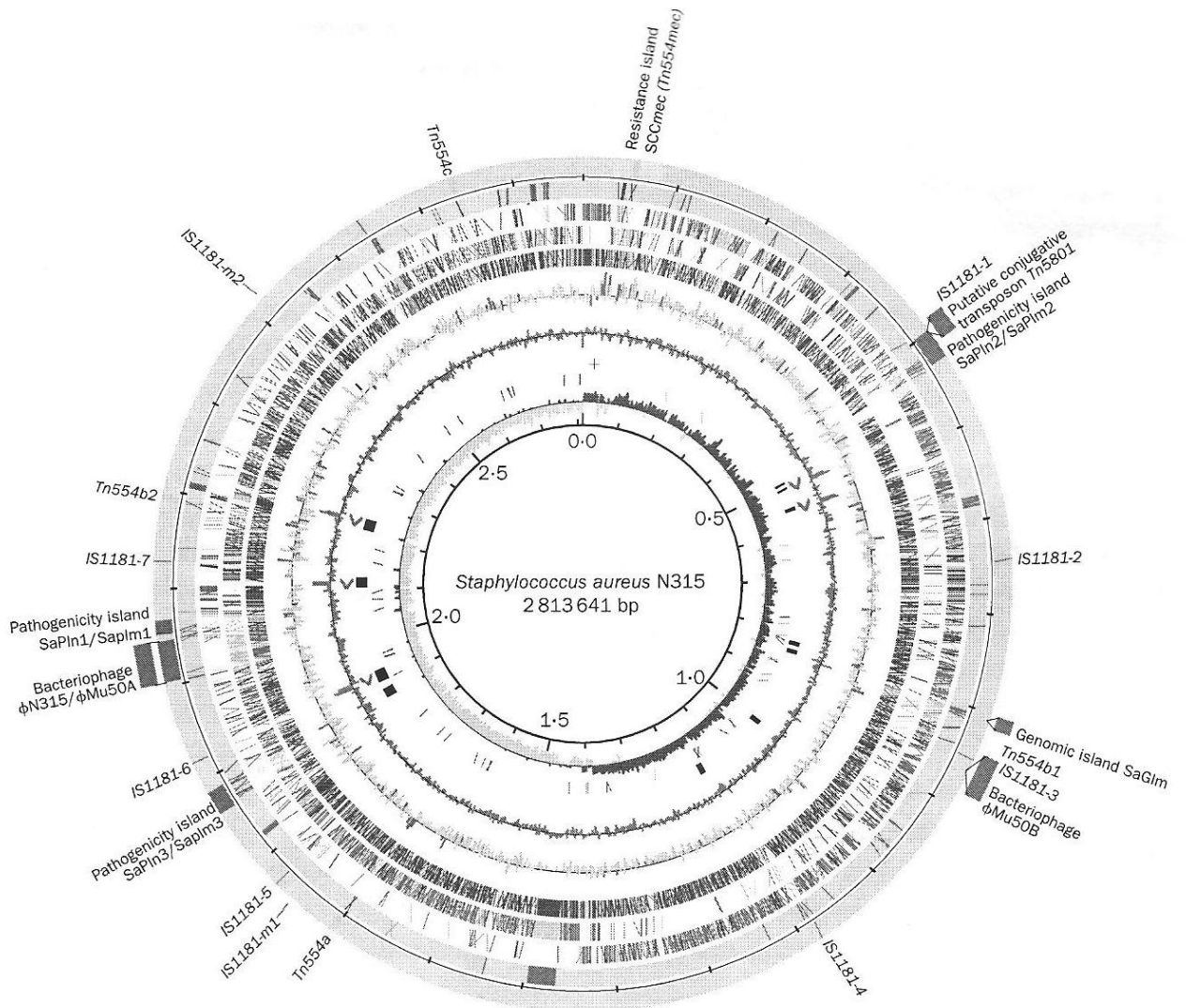
Tramite i microarray è possibile ricercare i principali geni codificanti per fattori di virulenza e antibiotico resistenza (Mobile Genetic Elements) e allo stesso tempo tramite i geni codificanti per proteine strutturali, di adesione e regolatrici (Core Variable genes) identificare il Clonal Complex di appartenenza (59,71) (figura 10).

Figura 10: Sintesi del protocollo utilizzato per il microarray



Inoltre mediante il sequenziamento completo del genoma è possibile identificare singoli SNPs (figura 11) e indagare più a fondo gli aspetti epidemiologici: conoscere la correlazione filogenetica tra i ceppi, capire se due isolati sono identici o no e quanto sono diversi tra loro, indagare gli outbreaks e chiarire gli eventi di trasmissione, identificare ceppi emergenti e dalle loro caratteristiche genetiche prevedere l'impatto che avranno sulla salute dell'uomo (71).

**Figura 11 : Genoma completo di MRSA N315**



# RISULTATI

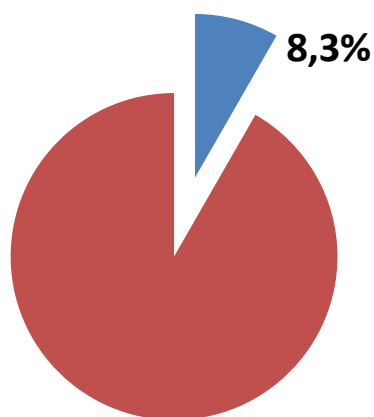
## Campioni alimentari e animali

Dall'analisi di 145 campioni animali e 71 campioni alimentari non è stato ritrovato nessun MRSA.

Sono stati isolati 12 ceppi MSSA dai campioni di alimenti di origine animale (8,3%) (figura 12) in particolare:

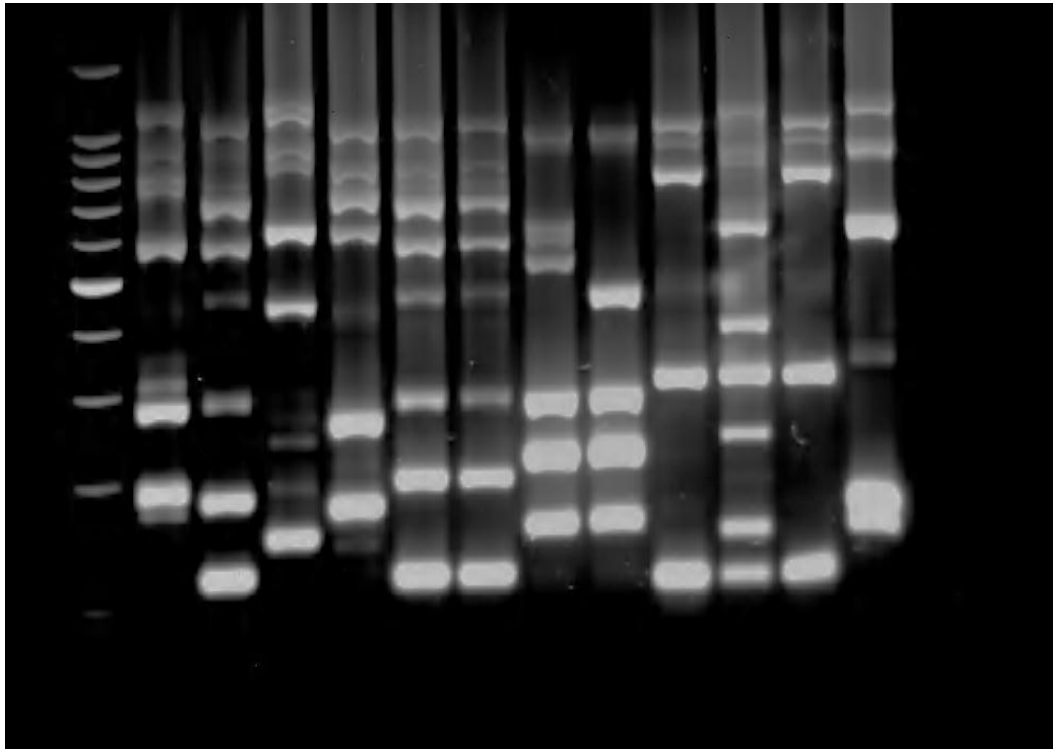
- 2 da latte (16.6 %),
- 6 da formaggio (7.3 %),
- 3 da carne (13 %),
- 1 da salume (5.3 %)

**Figura 12: Frequenza dell'isolamento di MSSA da campioni alimentari**



I ceppi MSSA raccolti sono stati sottoposti a tipizzazione molecolare mediante MLVA in modo da poter mettere in luce l'eventuale correlazione epidemiologica tra gli isolati (figura 13).

**Figura 13: Profili MLVA dei ceppi MSSA isolati, ladder 100bp.**



E' stato determinato inoltre il patotipo completo perché pur trattandosi di ceppi meticillino sensibili sono tutti isolati da alimenti ed è importante valutare l'impatto che essi possono avere sulla salute dell'uomo (tabella 32).

Tabella 32: Risultati delle amplificazioni per la determinazione del patotipo. Sono indicati i campioni alimentari contaminati da MSSA e la loro rispettiva natura; \*=-formaggio; \*\*=-latte; \*\*\*=-carne; \*\*\*\*=-salume.

Campioni	sea	sej	sec	sed	tst	eta	hlg	hla	hld	luke	lukpv	splb	cap5	cap8	sdrC	sdrE	icaA	fnbA	cna	cfa	dfb	atl	agr
C1*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	I/II
C4***	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	III
C5***	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	I
C6*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	I
C38*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	III
C42*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	III
C45*	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	I
C46*	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	I
C72****	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	II
C785****	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	II
C73hp****	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos	neg	pos	II
C122p****	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	I

# Tamponi nasali

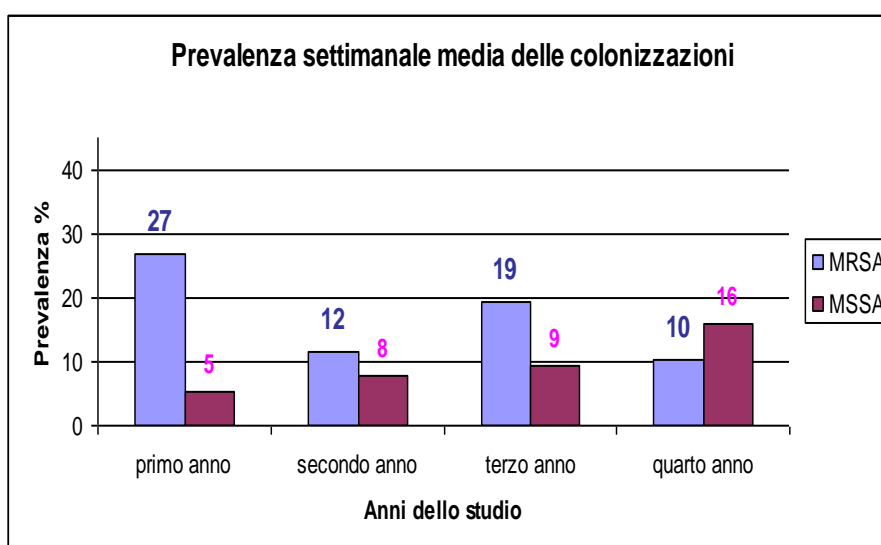
## UTIN

L'attività svolta in UTIN rientra in uno studio di sorveglianza iniziato nel mese di giugno del 2009 quindi ho a disposizione i dati relativi a quattro anni di studio. È stata stimata la prevalenza settimanale delle colonizzazioni da MRSA ed MSSA confrontando gli anni dello studio (tabella 33) (figura 14,15 e 16).

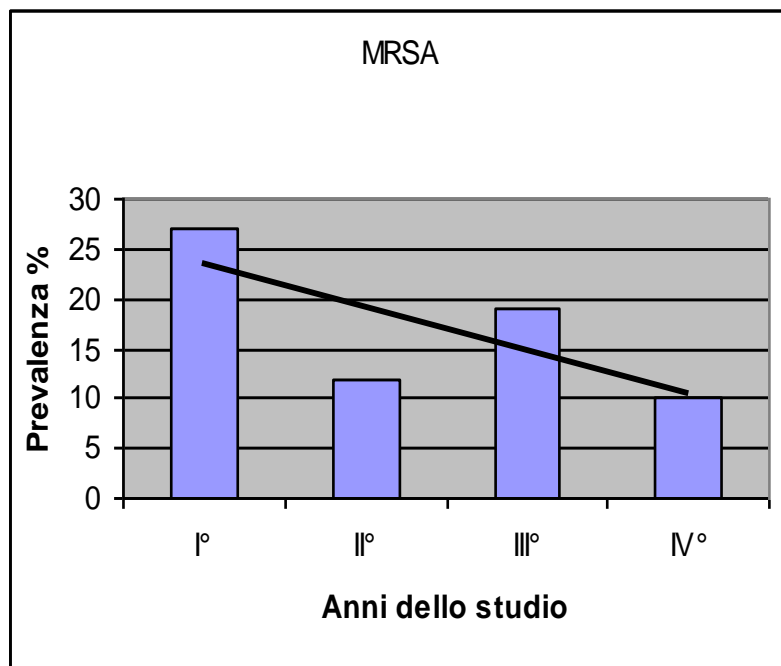
**Tabella 33: Prevalenza settimanale media delle colonizzazioni da MSSA e MRSA in quattro anni di studio**

Prevalenza settimanale media delle colonizzazioni	MRSA	MSSA
primo anno 2009/2010	27%	5%
secondo anno 2010/2011	12%	8%
terzo anno 2011/2012	19%	9%
quarto anno 2012/2013	10%	16%

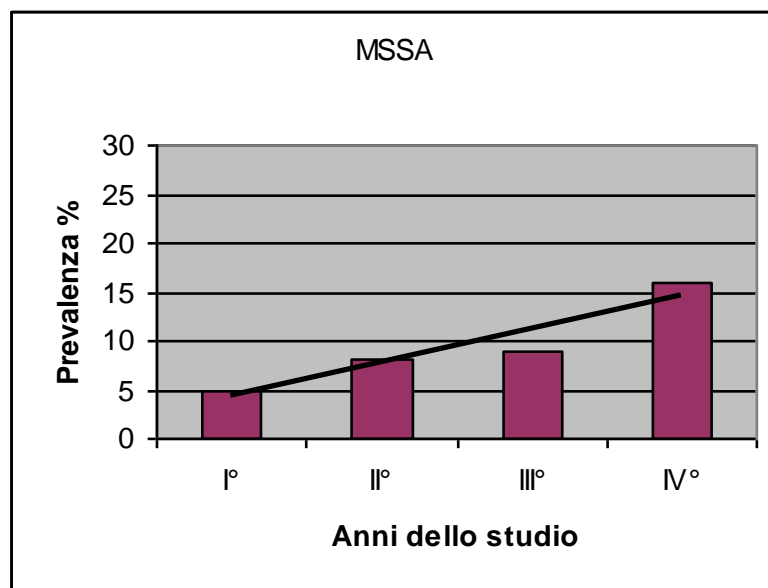
**Figura 14: Andamento della prevalenza settimanale media delle colonizzazioni durante i quattro anni di studio**



**Figura 15: Andamento della prevalenza settimanale media delle colonizzazioni da MRSA durante i quattro anni di studio**



**Figura 16: Andamento della prevalenza settimanale media delle colonizzazioni da MSSA durante i quattro anni di studio**





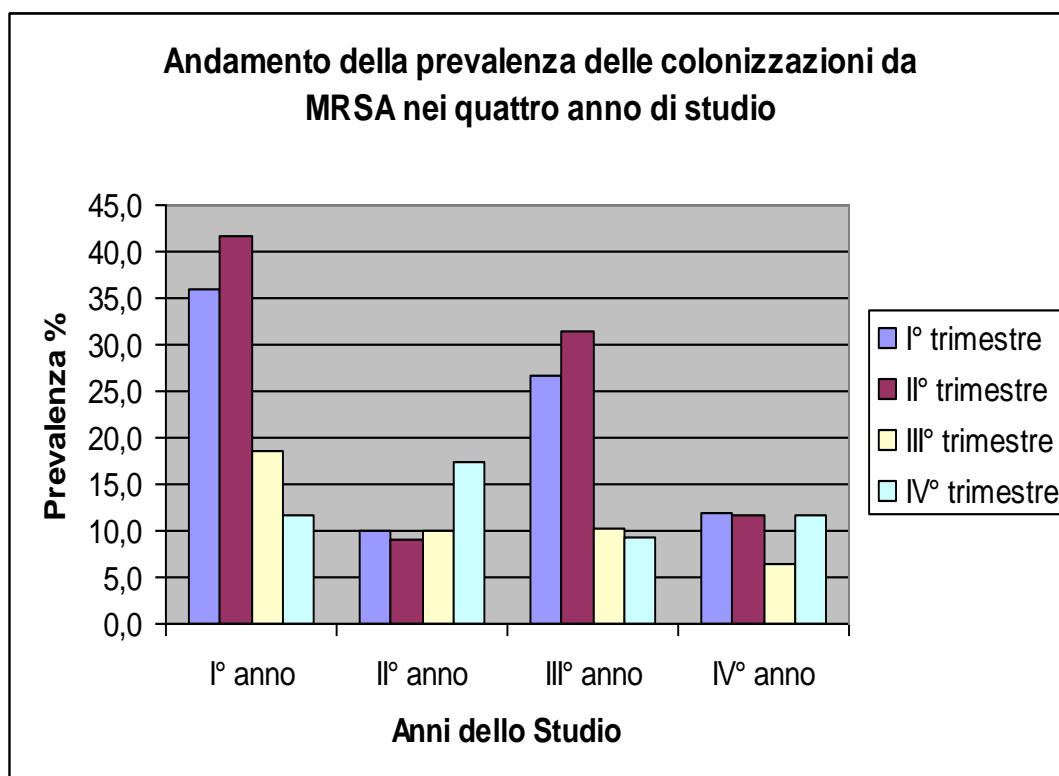
Nell'arco dei quattro anni di studio la frequenza delle colonizzazioni da MRSA tende a diminuire mentre aumenta quella relativa ad MSSA. I ceppi meticillino sensibili hanno in parte rimpiazzato i ceppi meticillino resistenti ; in maniera del tutto fisiologica col passare del tempo i ceppi MSSA sono andati ad occupare la nicchia ecologica prima relativa ai ceppi MRSA.

Osservando l'andamento generale delle colonizzazioni da MRSA in tutti gli anni di studio e per trimestre è possibile notare un picco delle colonizzazioni da MRSA nel terzo anno dello studio che in realtà è localizzato tra la fine del secondo e l'inizio del terzo anno (figura 17).

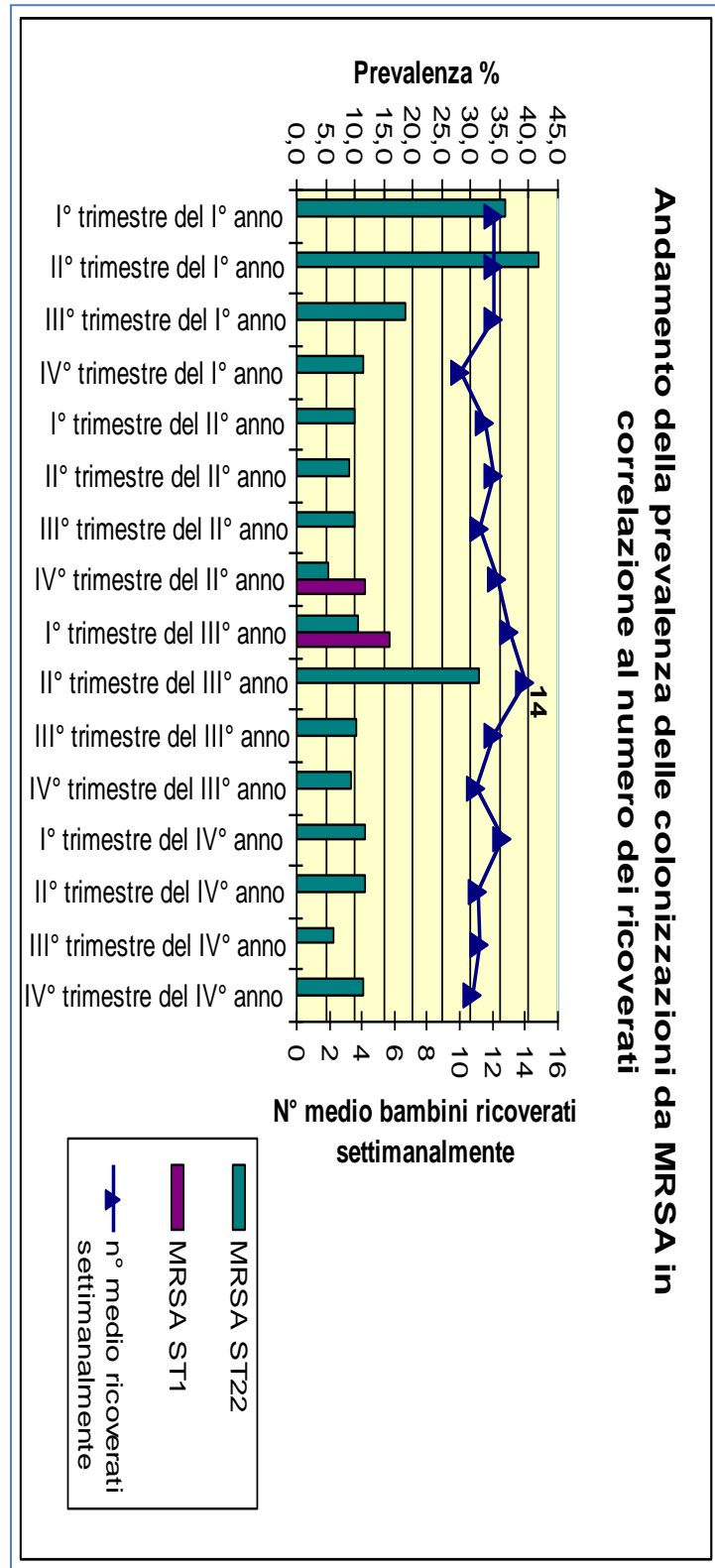
Due fattori cruciali hanno determinato l'elevata circolazione di MRSA nel reparto:

- la circolazione di un ceppo CA-MRSA (ST1)
- l'elevato numero di pazienti ricoverati (figura 18).

**Figura 17: Andamento della prevalenza delle colonizzazioni per trimestri nei quattro anni di studio**



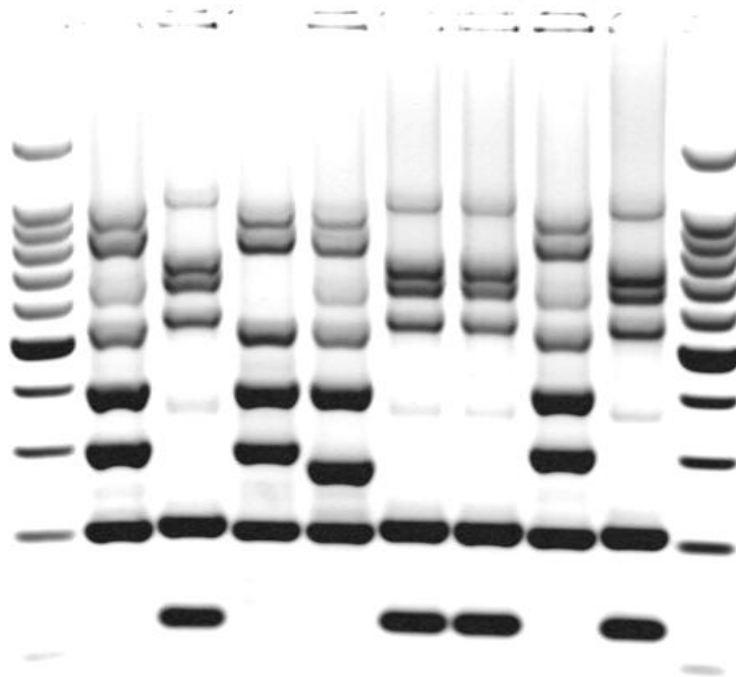
**Figura 18: Andamento della prevalenza delle colonizzazioni da MRSA ST22 e ST1 per trimestri nei quattro anni di studio**



Il ceppo MRSA ST1 è un ceppo comunitario che è riuscito ad inserirsi e diffondere nel reparto. Identificato inizialmente perché resistente alla gentamicina, questo ceppo per ben cinque mesi è riuscito a circolare nel reparto in contemporanea al ceppo ST22 costantemente presente.

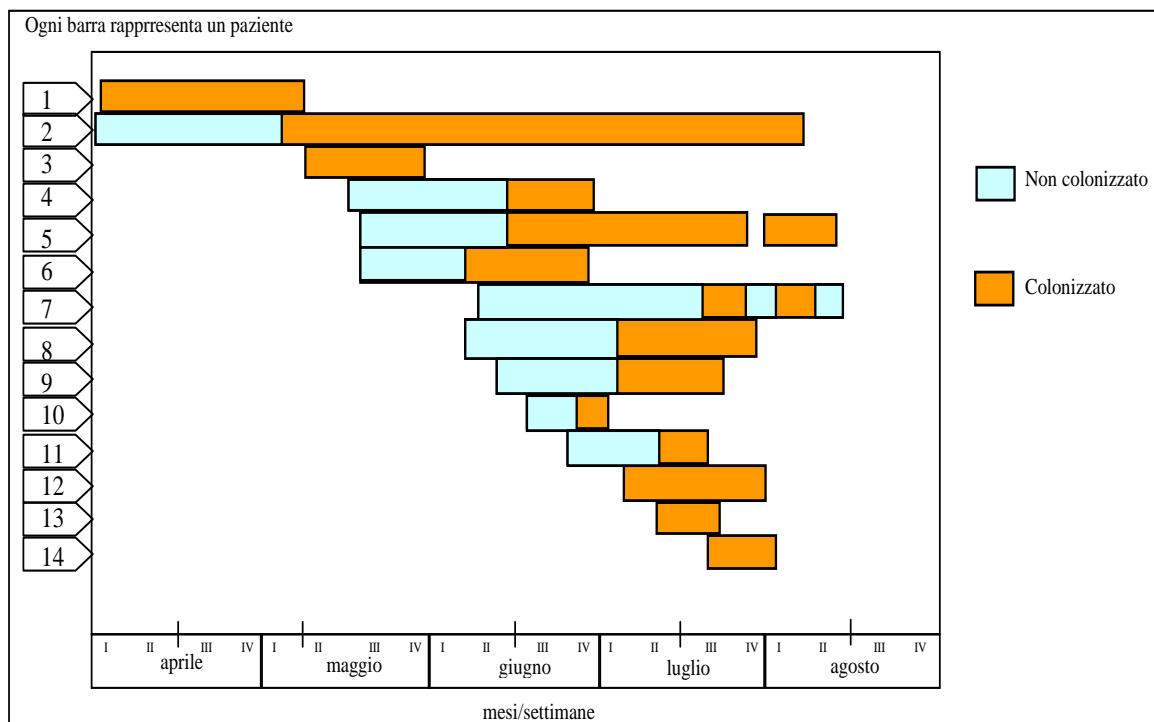
In questo contesto tutti gli MRSA isolati sono stati sottoposti ad antibiogramma completo e tipizzazione molecolare mediante MLVA. Inoltre la precisa identità del ceppo è stata stabilita mediante MLST (figura 19).

**Figura 19: Profili MLVA ceppi MRSA ST1 e ST22, ladder 100bp.**



Come mostrato in figura la notevole differenza tra i profili MLVA dei ceppi ST22 e ST1 ha di molto semplificato l'approccio d'indagine. Gli isolati ST1 sono stati facilmente distinti dagli altri ed è stato possibile chiarire tutti gli eventi di trasmissione (figura 20).

**Figura 20: Circolazione MRSA ST1 nel reparto**



In circa cinque mesi 14 bambini sono stati colonizzati da MRSA ST1. Il primo neonato colonizzato proviene da un precedente ricovero in un altro ospedale e probabilmente era già colonizzato al momento dell'ammissione in UTIN. Una volta inseritosi nel reparto, il ceppo ST1 pur essendo di origine comunitaria ha trovato modo di diffondere in maniera significativa. Certamente la circolazione del ceppo all'interno del reparto tra i pazienti ricoverati è stata facilitata da fattori come il sovraffollamento del reparto e le lunghe degenze dei neonati. È importante precisare che la diffusione di questo ceppo è stata arrestata solo nel momento in cui l'ultimo neonato colonizzato è stato dimesso.

MRSA ST22 è il ceppo costantemente presente all'interno della nostra UTIN e come tale può essere definito il ceppo principale o dominante. Altri ceppi seppur sporadici sono stati identificati nei quattro anni di studio in particolare:

- tra tutti i ceppi MRSA isolati solo 5 non sono ST22,
- identificati come ST7,8, 45 e 97.

MRSA ST22 è identificato di routine nei tamponi nasali dell'UTIN.

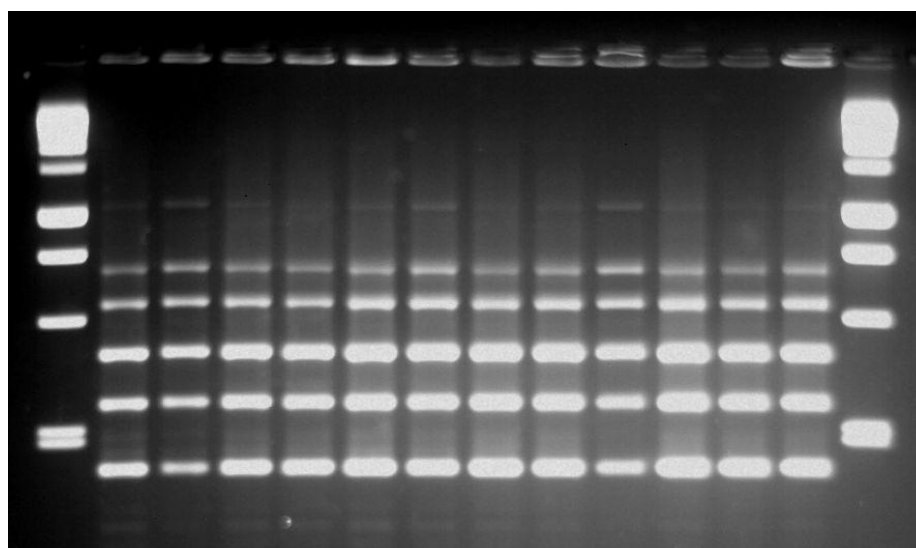
Tre profili di antibiotico resistenze molto simili tra loro sono generalmente associati a questo ceppo e sono mostrati in tabella 34.

**Tabella 34: Antibiotico resistenze di MRSA ST22**

Va	Tec	Cro	Fep	Clr	Ipm	Tzp	Sxt	Cip	Lev	Lzd	Cn	Te	Rd	Da	E	Fox
S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	<u>S</u>	S	S	S	R
S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	<u>R</u>	S	S	S	R
S	S	R	R	S	S	<u>R</u>	S	S	S	S	S	<u>R</u>	S	S	S	R

L'esecuzione semplice, economica e repentina della metodica MLVA consente di determinare la correlazione epidemiologica tra gli isolati e stabilire se essi sono assimilabili al ceppo ST22 (figura 21).

**Figura 21: Profilo MLVA MRSA ST22; ladder 1kb.**



L'identità del ceppo (ST22) è stata stabilita mediante MLST e determinazione dell' SCCmec (IVa). Dall'applicazione del microarray l'identità del ceppo è stata chiarita del tutto ed uniformata a standard di nomenclatura internazionali:

CC22-MRSA IV tst1+/ UK-EMRSA-15  
 “Middle Eastern Variant”

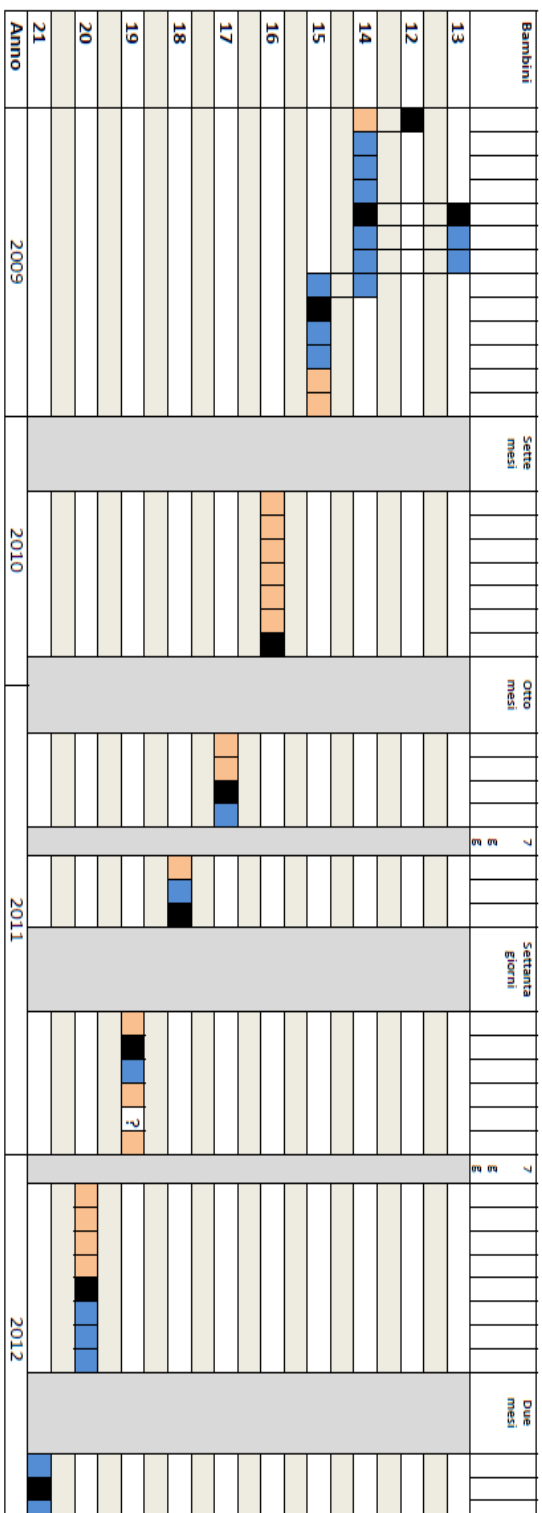
Nello specifico una selezione di ceppi MRSA è stata analizzata mediante microarray e sequenziamento presso lo Statens Serum Institute di Copenaghen (tabella 35).

**Tabella 35: Ceppi selezionati**

Isolati	Ospedale	Reparto	Campione biologico	Data di isolamento
1	Civico	Terapia intensiva	Broncoaspirato	02/2009
2	Civico	Dermatologia	Tampone da ulcera	04/2009
3	Civico	Terapia intensiva	Broncoaspirato	05/2009
4	Civico	Terapia intensiva di cardiologia	Catetere venoso periferico	06/2009
5	Cervello	Ematologia	Emocoltura	07/2009
6	Cervello	Pneumologia	Espettorato	09/2009
7	Civico	Chirurgia oncologica	Tampone da ferita	09/2009
8	Civico	Terapia intensiva	Sconosciuto	11/2009
9	Civico	Chirurgia plastica	Tampone dal piede	11/2009
10	Civico	Chirurgia vascolare	Tampone dalla gamba	11/2009
11	Cervello	Terapia intensiva	Broncoaspirato	12/2009
12	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	10/2009
13	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	11/2009
14	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	11/2009
15	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	12/2009
16	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	09/2010
17	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	08/2011
18	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	08/2011
19	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	11/2011
20	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	02/2012
21	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	05/2012
22	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	11/2011
23 (MSSA)	Policlinico	UTIN	Tampone nasale	11/2011

I ceppi selezionati e sottoposti a queste indagini aggiuntive sono stati analizzati con attenzione per chiarire gli eventi di trasmissione dentro il reparto ed eventuali fattori di rischio specifici (tabella 36 e 37).

Tabella 36: Degenze dei bambini in UTIN; i quadrati arancio indicano tamponi nasali negativi per MRSA, il blu e il nero tamponi nasali positivi per MRSA e in particolare il nero indica gli isolati selezionati per la tipizzazione



**Tabella 37: Procedure invasive e terapia antibiotica**

Bambini	Sondino nasogastrico (gg)	Nutrizione parenterale (gg)	Catetere venoso centrale (gg)	Catetere venoso periferico (gg)	Tubo endo-tracheale (gg)	nCPAP (gg)	antibiotici (gg)
12	✓ 2	✓ 10	✓ 5	✓ 6	x	✓ 5	✓ 10
13	x	✓ 12	x	✓ 2	x	x	x
14	✓ 43	✓ 15	✓ 12	✓ 3	✓ 2	✓ 9	✓ 8
15	✓ 20	✓ 2	x	✓ 2	x	x	x
16	Nessun dato						
17	✓ 8	✓ 10	✓ 4	✓ 7	x	✓ 2	✓ 7
18	x	✓ 4	x	✓ 4	x	x	✓ 4
19	✓ 45	x	x	x	x	x	x
20	✓ 42	✓ 40	✓ 40	x	✓ 8	✓ 7	✓ 19
21	x	✓ 7	x	✓ 7	x	x	x

Tra i ceppi selezionati 5 sono stati esclusi dalle analisi al microarray perché risultati negativi all'amplificazione dei mecA (isolati numero 3, 7, 8, 22 e 23).

Tutti risultati del microarray sono illustrati nelle tabelle seguenti (tabelle 38-47).



Samples	MRSA (meca)	PVL	rmDI	gapA	katA	coa	nucI	spa	sbi	sarA	saes	vras	agri (total)	agr- B1	agr- C1	agr- D1	hld	meCA	delta-meCR	
1																				
2																				
4																				
5																				
6																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				

Tabella 38: Risultati del microarray; il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	ugpQ	Q9XB68-dcs	ccr A-2	ccr B-2	blaz	blal	blar	ermC	tetK	cat	cat (pC221)	fosB	tstI (consensus)	tstI (human allele)	sec
1															
2															
4															
5															
6															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															

Tabella 39: Risultati del microarray; il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	seg	sei	sel	selm	seln	selo	egc	selu	luKS (ST72+ST45)	hlgA	luXx	hl	hlIII (other than RF122)	h1b_ probe 1	prob e2	probe3
1																
2																
4																
5																
6																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																
19																
20																
21																

Tabella 40: Risultati del microarray: il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	un-disrupted hlb	sak	chp	scn	aur (consensus)	aur (MRSa252)	sspA	sspB	sspP (consensus)	sspP (other than ST93)	setC/setX	ssi01/set6 probe2_11
1												
2												
4												
5												
6												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												

Tabella 41: Risultati del microarray: il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	ssl01/set6_ probel_12	ssl01/set6 (MRSA252)	ssl02/set7	ssl02/set7 (MRSA252)	ssl04/set9 (MRSA252,SAR0425)	ssl05/set3 probe 1	ssl05/set3 (MRSA252)	ssl07/set1 (AF188836)	ssl09/set5 probe 1	probe 2
1										
2										
4										
5										
6										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										

Tabella 42: Risultati del microarray: il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	ssl10/set4	cap 5 (total)	capH5	capK5	capJ5	Ica A	Ica C	Ica D	bbp (total)	bbp (consensus)	cfaA (total)	cfaA (consensus)	cfaA (MU50+MW2)
1													
2													
4													
5													
6													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													

Tabella 43: Risultati del microarray; il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	cfbB (total)	cfbB (consensus)	cna	ebps (total)	ebps_ probe 614	ebps (COL)	eno	fib (MRS252)	fnbA (total)	fnbA (consensus)	fnbA (Mu50+MW2)	fnbB (tot)
1												
2												
4												
5												
6												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												

Tabella 44: Risultati del microarray; il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	fnbB (MW2)	map (total)	map (Mu50+MW2)	sasG (total)	sasG (MW2)	sasG (other than MRSA252+RF122)	sdrc (total)	sdrc (consensus)	sdrc (Mu50)	sdrc (other than MRSA252+RF122)	sdrc (total)
1											
2											
4											
5											
6											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											

Tabella 45: Risultati del microarray; il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella



Samples	sdrD (consensus)	sdrD (other)	wvb (total)	wvb (consensus)	wvb (RF122)	isab (MRSA252)	mprf (Mu50+MRSA252)	isdA (consensus)	isd (other than MRSA252)	ImrP (other thanRF122) probel
1										
2										
4										
5										
6										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										

Tabella 46: Risultati del microarray: il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

Samples	hmrp (other than RF122)_probe2	hds2(Mu50+N315+COL+USA300+NCTC8325)	hds2(MW2+MSSA476)	hdsx (CC25)	Q7A4X2	hysA1 (MRSa252+RF122) and/or hysA2 (consensus)	hysA2 (all other than COL+USA300+NCTC8325)_probe1
1							
2							
4							
5							
6							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							

Tabella 47: Risultati del microarray; il rosa indica risultato positivo, il verde negativo e il giallo ambiguo, i geni assenti in tutti gli isolati non sono mostrati in tabella

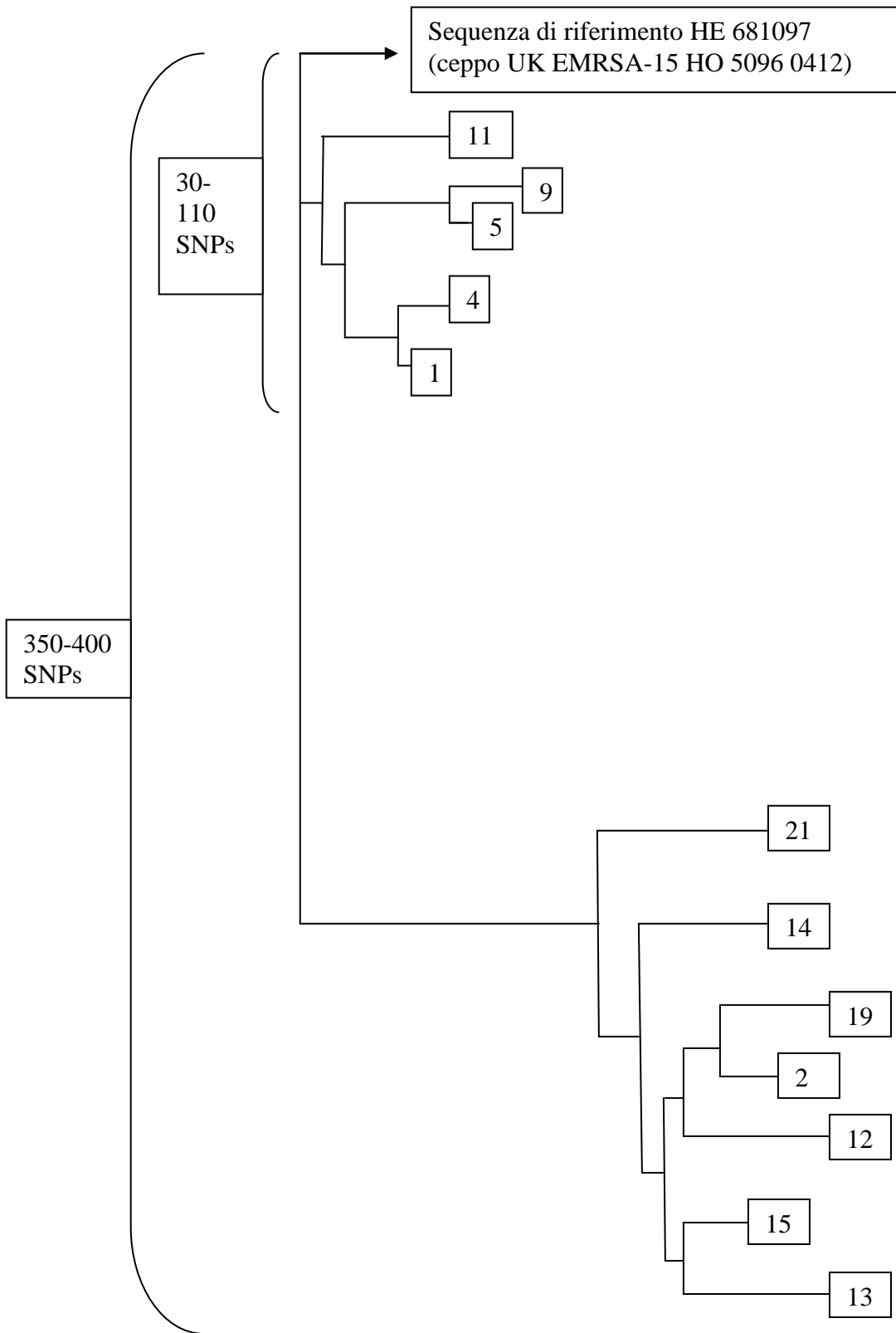
In seguito tutti gli isolati UTIN sono stati sottoposti ad amplificazione del gene *tst-1* e sono risultati positivi a conferma dell'identità del ceppo:

CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15

“Middle Eastern Variant”

Infine i risultati ottenuti dal sequenziamento sono mostrati in figura 22.

Figura 22: Risultati del sequenziamento, correlazione tra gli isolati e SNPs

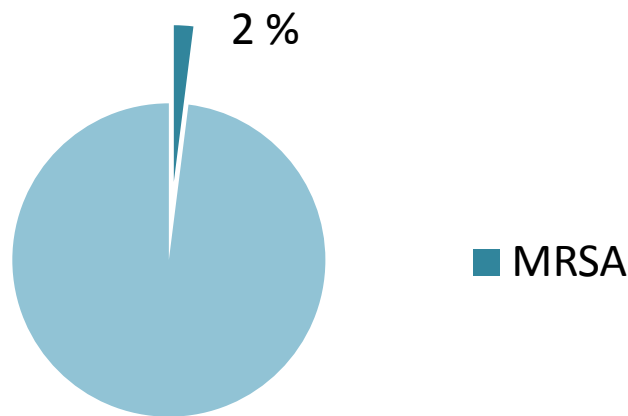


# Tamponi nasali

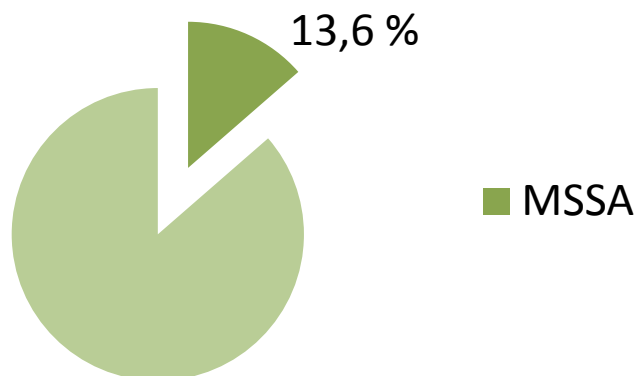
## Asili nido

Lo studio svolto presso gli asili nido comunali di Palermo ha consentito la raccolta di importanti informazioni sulla circolazione di ceppi MRSA e MSSA in comunità considerando che si tratta di tamponi nasali raccolti tra bambini al sotto dei tre anni di età, in buona salute e in assenza di particolari fattori di rischio. Analizzando 500 tamponi nasali provenienti da 26 differenti asili comunali sono stati isolati 10 MRSA e 68 MSSA quindi la frequenza delle colonizzazioni è pari al 2% e 13.6% rispettivamente (figura 23 e 24).

**Figura 23: Prevalenza percentuale delle colonizzazioni da MRSA**



**Figura 24: Prevalenza percentuale delle colonizzazioni da MSSA**



I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli dell'ultimo anno (il quarto) di studio in UTIN (figura 25) e con alcuni dati disponibili in Letteratura (tabella 48) (75).

**Figura 25: Confronto tra i dati relativi agli asili nido e UTIN con riferimento alla prevalenza percentuale delle colonizzazioni da MRSA e MSSA**

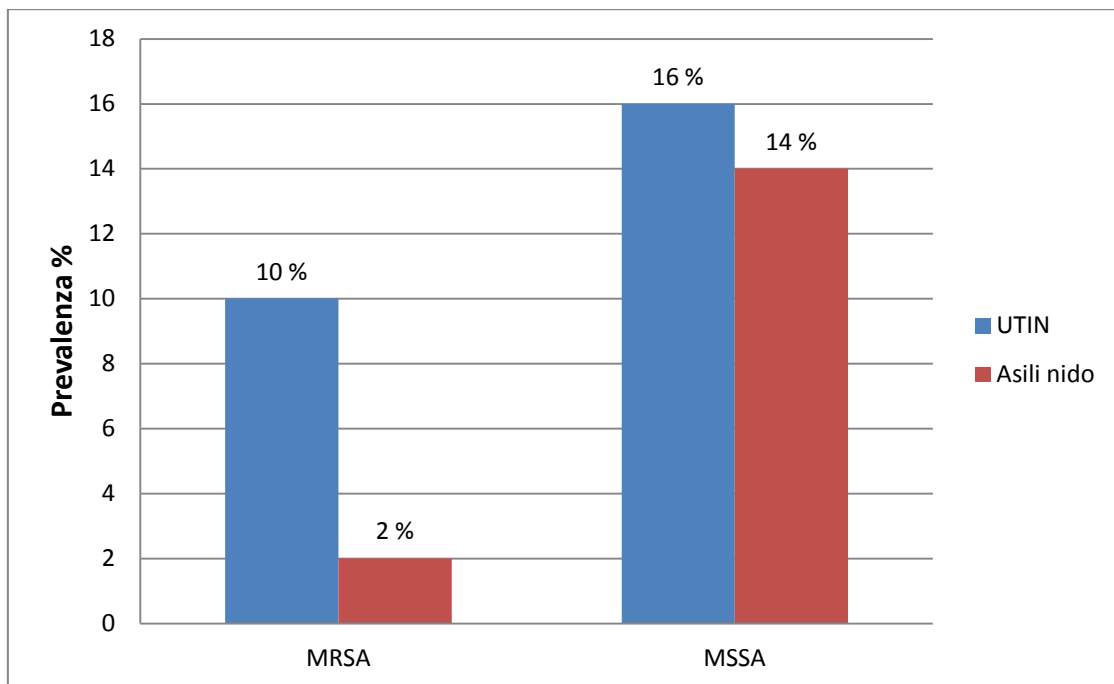


Tabella 48: Confronto tra i nostri risultati e quelli provenienti da uno studio di meta-analisi di recente pubblicazione (75)

<b>Prevalenza colonizzazioni MRSA</b>	<b>Meta-analisi</b>	<b>Dal nostro studio</b>
Bambini <5 anni reclutati in comunità	3%	2%
Bambini < 5 anni	5.4%	10%
Bambini < 28 giorni reclutati in ospedale	6.7%	

Tutti i ceppi MRSA isolati dagli asili nido comunali sono stati sottoposti ad antibiogramma (tabella 49).

MORSA	Cip	Da	Ipm	E	Lrd	Ler	Cu	Chr	Rd	Srt	Te	MIC	
												S < 2	R > 2
												Va	Tec
3A	S	R*	S	R	S	S	S	R	S	S	R	1.5	0.75
11B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	1
3I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	0.5
2L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1	0.38
7L	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	3	0.75
7M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1.5	0.75
7S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1.5	0.5
23U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	0.5
16V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1.5	0.5
17X	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1.5	0.38

Tabella 49: Antibiogramma con metodo Kirby-Bauer Disk Diffusion per ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), imipenem (10µg), eritromicina(5µg), linezolid (30µg), levofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), clatromicina (15µg), rifampicina (5µg), sulfametazolo-trimetoprim (25µg) and tetraciclina (30µg). MIC (E-test) per vancomicina e teicoplanina.

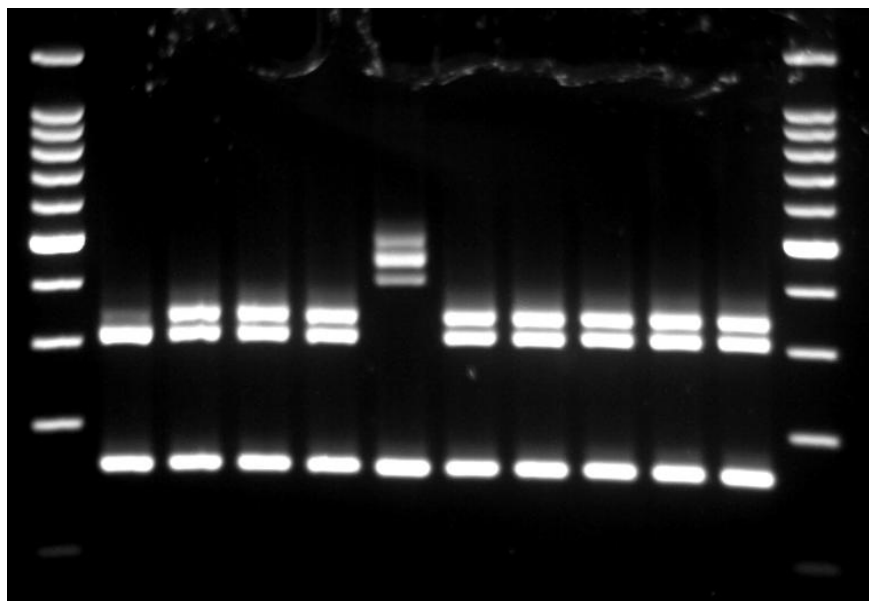
\*resistenza alla clindamicina indotta da macrolidi



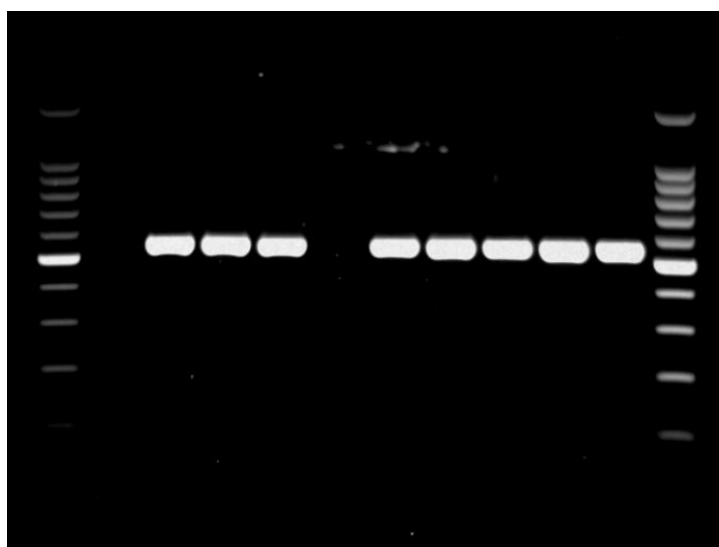
Questi 10 ceppi MRSA isolati sono stati inoltre tipizzati (figura 26 e 27):

- 8/10 sono *tst*-1+; identificati come CC22-MRSA IV *tst*1+/ UK-EMRSA-15 “Middle Eastern Variant” e mediante *spa* typing come il ceppo t223;
- i restanti 2 sono entrambi *tst*-1- identificati come ST1 IVa e ST398 V.

**Figura 26: Risultati della PCR multiple per la determinazione dell'SCCmec, ladder 100bp.**



**Figura 27: Risultati della PCR per il gene *tst*, ladder 100bp.**



Tra i 68 ceppi MSSA isolati, 5 sono stati identificati come ST22 MSSA t223 e ulteriori accertamenti sono in corso per chiarire la correlazione con i rispettivi isolati MRSA.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'attività di ricerca svolta in questi tre anni ha chiarito molti aspetti riguardo la circolazione di ceppi MRSA e la loro epidemiologia locale. In primo luogo è stata valutata l'entità del problema in termini di frequenza di isolamento di MRSA e MSSA in campioni biologici di varia natura: alimentari, animali, tamponi nasali da bambini reclutati in ospedale ed in comunità. Successivamente, è stato possibile effettuare confronti e valutazioni specifiche.

In particolare nessun ceppo MRSA è stato isolato da campioni alimentari e animali. La frequenza delle colonizzazioni da MRSA nell'ultimo anno di studio in UTIN è stata stimata pari al 10% e tra i bambini degli asili nido comunali al 2%. Certamente l'assenza di ceppi MRSA nei campioni alimentari e animali analizzati non indica totale sicurezza della catena alimentare ma semplicemente un basso rischio ad essa associato. Nel nostro contesto, infatti, al basso rischio correlato alla catena alimentare ed ai ceppi di origine animale si accompagna l'elevata e preoccupante diffusione di ceppi meticillino resistenti nel contesto ospedaliero. In parallelo l'emergente circolazione in comunità desta grandi preoccupazioni.

Tutti i dati ottenuti tramite questo progetto di ricerca sono stati confrontati con dati di Letteratura ed in particolare con uno studio di meta-analisi di recente pubblicazione (75). Emerge come le frequenze delle colonizzazioni da MRSA stimate, seppur a livello locale, sono perfettamente concordanti con quanto scritto in Letteratura. Nel dettaglio la frequenza di colonizzazione da MRSA tra bambini reclutati in comunità, in buona salute e al di sotto dei tre anni è stimata in uno studio di meta-analisi pari al 3 % mentre nel nostro studio al 2%. D'altra parte nello stesso studio di riferimento si valuta la frequenza di colonizzazione da MRSA tra bambini reclutati in ospedale al di sotto dei 28 giorni di vita pari al 6.7% dato leggermente inferiore a quanto riportato nel nostro studio (10%). Quest'ultima differenza può essere facilmente motivata pensando al reparto ad alto rischio in cui si è svolto il nostro studio. Si tratta di una UTIN quindi un'unità di terapia intensiva e come tale numerosi fattori di rischio possono essere identificati per la tipologia di pratiche assistenziali erogate e le condizioni critiche dei neonati ricoverati (immunocompromessi, debilitati, malformati o sottopeso). Tutti questi fattori, nonché il sovraffollamento del reparto e il ridotto numero di personale medico-infermieristico, possono incidere notevolmente sulla circolazione di microrganismi antibiotico resistenti nel reparto.

Confrontando i dati relativi allo studio in UTIN e quello presso gli asili nido comunali e le rispettive percentuali di colonizzazioni da MRSA (10% e 2%) è possibile definire l'ambiente ospedaliero e in particolare le unità di terapia intensiva come il principale ambiente a rischio per MRSA. Certamente la circolazione in comunità di vari microrganismi antibiotico resistenti tra cui MRSA è un problema emergente ma bisogna riconoscere che ad oggi questo ha ancora entità minore se paragonato al contesto ospedaliero. È importante in questa fase raccogliere il maggior numero possibile di dati rappresentativi della situazione in comunità e in ospedale in modo da poter realizzare interventi mirati e coordinati da più fronti per arginare e risolvere il problema.

Il programma di sorveglianza svolto in UTIN consente di monitorare settimanalmente le colonizzazioni nasali da MRSA e MSSA quindi la loro circolazione all'interno del reparto e il rischio a cui i neonati ricoverati sono esposti durante tutto il periodo di degenza. Si tratta di uno studio iniziato nel Giugno 2009 e tuttora in corso. I dati ottenuti, relativi a quattro anni di studio, testimoniano l'efficacia del programma; la frequenza di colonizzazione da MRSA si è ridotta dal 27% del primo anno di studio (2009/2010) al 10% del quarto anno (2012/2013). Già nel primo anno di studio tra il primo trimestre e il quarto si nota una significativa differenza in termini di frequenza di colonizzazioni da MRSA (partendo dal 35-40% nei primi due trimestri si arriva intorno al 10% nell'ultimo trimestre) e nei periodi seguenti la circolazione di ceppi MRSA sembra stabilizzarsi (intorno al 10%). Gli ottimi risultati ottenuti hanno incoraggiato a proseguire il programma e hanno stimolato la conoscenza e consapevolezza del problema del personale medico-infermieristico. In parallelo specifici interventi di educazione e formazione hanno consentito la buona collaborazione con il reparto quindi il buon esito del programma.

Svolgendo questa attività di sorveglianza settimanale è stato possibile mettere in luce fluttuazioni e/o picchi nella circolazione di MRSA e la loro origine. In particolare il picco di frequenza delle colonizzazioni da MRSA a cavallo tra la fine del secondo anno di studio (2010/2011) e l'inizio del terzo (2011/2012) è associato alla circolazione di un ceppo CA-MRSA identificato come ST1. All'interno della nostra UTIN, infatti, oltre ad un ceppo dominante a livello locale (ST22) è stata identificata la circolazione per ben cinque mesi del ceppo ST1. Il ceppo MRSA ST1 è un ceppo di origine comunitaria che si è inserito nel reparto, diffondendo tra Aprile e Agosto 2011 e colonizzando ben 14 neonati. Inizialmente il ceppo è stato isolato e distinto da ST22 perché resistente alla gentamicina. Successivamente, analisi di tipo molecolare ne hanno stabilito la precisa identità e hanno consentito di

ricostruire gli eventi di trasmissione. Fortunatamente, i profili MLVA di MRSA ST1 e ST22 sono facilmente distinguibili e l'esecuzione di routine della metodica MLVA ha consentito di distinguere i due ceppi. Inoltre dalla ricostruzione della catena di trasmissione è stato possibile identificare un caso indice; si tratta di un neonato precedentemente ricoverato in un altro ospedale che ha probabilmente inserito MRSA ST1 nella nostra UTIN. In circa cinque mesi 14 bambini sono stati colonizzati da MRSA ST1. Certamente la circolazione del ceppo all'interno del reparto tra i pazienti ricoverati è stata facilitata da fattori come il sovraffollamento del reparto e le lunghe degenze dei neonati. Il rimpiazzo dei ceppi ospedalieri da parte di ceppi comunitari è un fenomeno globale e spontaneo nell'epidemiologia di MRSA ma preoccupante e da tenere sotto controllo. In questo contesto, lo studio di sorveglianza consente di conoscere fenomeni nell'epidemiologia locale che altrimenti sarebbero sottostimati e soprattutto fornisce informazioni in tempi brevi ed utili per eventuali interventi di controllo. Nel nostro caso l'eradicazione del ceppo ST1 dal reparto è stata possibile solo quando l'ultimo neonato colonizzato è stato dimesso. Il picco nella circolazione di MRSA nel secondo trimestre del terzo anno è associato alla condizione di sovraffollamento del reparto perché si registrano in media 14 pazienti ricoverati per settimana. Questo dato non è per niente sorprendente perché condizioni come sovraffollamento e mancanza di personale sono quelle che maggiormente incidono come fattori di rischio per le infezioni nosocomiali.

I ceppi MRSA isolati sono stati tutti sottoposti ad antibiogramma e tipizzati con metodi molecolari. In particolare la metodica MLVA è stata eseguita su tutti i ceppi e altri metodi più approfonditi su una selezione d'isolati. La sorveglianza nei quattro anni ha reso evidente la costante circolazione di un ceppo MRSA successivamente identificato come CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 "Middle Eastern Variant". In un primo momento i ceppi sono distinti mediante antibiogramma ed MLVA. Fortunatamente il ceppo predominante a livello locale non è un ceppo particolarmente antibiotico resistente e mostra un profilo MLVA caratteristico e distintivo. L'identità del ceppo è stata inizialmente determinata mediante PRC multiplex per SCCmec e MLST. Gli isolati sono stati identificati come MRSA ST22-IVa e una selezione di questi è stata sottoposta a microarray e whole genome sequencing. Proprio il microarray ha consentito sia di indagare a fondo sul genoma degli isolati ponendo in evidenza la presenza del gene *tst-1*, confermata mediante PCR, sia di dare un'identificazione completa al ceppo come CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 "Middle Eastern Variant". Il ceppo ritrovato è quindi semplicemente una variante *tst-1+* del UK-EMRSA-15 non è la classica Barnim Variant diffusa negli ospedali di tutto il mondo ma la Middle Eastern Variant

precedentemente identificata ad Abu Dhabi, in USA da cittadini di origine straniera e nella striscia di Gaza (76 e 77). Il sequenziamento dei genomi e il confronto degli SNPs ha consentito di stimare la variabilità esistente tra gli isolati nell'arco dei quattro anni di attività di sorveglianza.

Lo studio svolto presso gli asili nido comunali di Palermo ha consentito di raccogliere preziose informazioni sulla circolazione di MRSA in comunità ed in particolare tra bambini al di sotto di 3 anni, in buona salute ed in assenza di specifici fattori di rischio. Da 26 asili nido comunali con capienza di 988 bambini sono stati raccolti 617 consensi informati da parte dei genitori e 500 tamponi nasali. Sono stati isolati 10 MRSA inizialmente sottoposti ad antibiogramma, MLVA, PCR multiplex per la determinazione dell'SCCmec e PCR per *tst-I*. Tra questi 10, 8 sono stati identificati come CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 "Middle Eastern Variant"; i restanti due sono risultati negativi all'amplificazione per *tst-I*, resistenti a clindamicina ed eritromicina e rispettivamente identificati come ST1con SCCmec IVa e ST398 con SCCmecV. L'unico isolato ST398 è inoltre resistente alla vancomicina (MIC= 3 mg/L). Due MRSA sono stati ritrovati in due bambini provenienti dallo stesso asilo ma non è stata identificata nessuna correlazione tra di essi, né tra i bambini in questione né tra i ceppi isolati. In parallelo alla raccolta dei consensi informati per l'esecuzione dei tamponi nasali, a tutti i genitori è stato somministrato un questionario con l'obiettivo di valutare l'associazione con fattori di rischio come precedenti ospedalizzazioni, utilizzo di antibiotici e contatto con animali. Nessun fattore di rischio è risultato associato ai casi di colonizzazione osservati.

La frequenza delle colonizzazioni da MRSA stimata coincide con quanto riportato in Letteratura (74) ma il dato più interessante è che un identico ceppo CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 "Middle Eastern Variant" è il principale circolante nel contesto ospedaliero ed in comunità. Non è facile in questi casi stabilire la vera natura e origine della circolazione di MRSA in due contesti così diversi ma bisogna ammettere che adattamento e rimpiazzo tra ceppi sono fenomeni caratteristici nell'epidemiologia di MRSA a livello globale.

A concludere l'identificazione di questo isolato comune tra UTIN e asili nido è stata effettuato lo *spa* typing. In accordo con quanto riportato in Letteratura (71,76,77,78) si tratta dello *spa* type 223 in precedenza identificato in USA. I dati disponibili sulla circolazione di questo ceppo sono piuttosto limitati ma probabilmente il fenomeno è fortemente sottostimato perché l'unica caratteristica distintiva di questa variante rispetto alla Barnim Variant è la

presenza del gene *tst-1*. Molto spesso gli MRSA isolati sono infatti testati per PVL ma non per *tst-1*.

Ulteriori indagini sono necessarie per capire l'origine e la futura evoluzione di questo ceppo. In particolare il ceppo identificato nella striscia di Gaza ST22-MRSA *spa t223* (76) in seguito ad analisi genetiche si è dimostrato maggiormente correlato a ST22-MSSA *spa t223* che non a EMRSA-15. È probabile che l'evoluzione a livello locale dei ceppi generi nuove varianti e che poi queste siano in grado di diffondere notevolmente nell'area interessata. Nel nostro caso bisogna ancora chiarire a fondo l'origine di questo ceppo e la possibile evoluzione futura. Non è da escludere una correlazione dei nostri isolati con quelli riportati in Letteratura (71,76,77,78) e probabilmente esiste un progenitore comune tra i vari ceppi *spa t223* oggi circolanti nell'area mediterranea. Tutti i dati raccolti a livello locale possono essere integrati tra loro per fornire una visione completa a livello globale e comprendere l'epidemiologia di MRSA e MSSA ad ampio raggio.

L'esperienza di questi anni di attività di ricerca ha consentito di ottimizzare anche l'esecuzione delle tecniche di tipizzazione molecolare. Di routine MLVA, PCR multiplex per SCCmec e PCR per *tst-1* consentono l'identificazione di CC22-MRSA IV *tst1+*/ UK-EMRSA-15 "Middle Eastern Variant". I ceppi che appaiono diversi a questo primo approccio vengono di seguito indirizzati alla tipizzazione mediante MLST.

Rispetto ad MRSA, la diffusione di MSSA nei diversi campioni biologici analizzati è più omogenea con frequenze di isolamento:

- 8.3 % tra campioni alimentari ed animali
- 16 % tra i tamponi nasali provenienti dall'ultimo anno di studio in UTIN
- 14 % tra i tamponi nasali provenienti dagli asili nido.

I ceppi meticillino sensibili sono all'incirca equamente rappresentati nei vari contesti. Nel caso specifico dello studio in UTIN nell'arco di quattro anni di studio la frequenza di colonizzazione da MSSA è aumentata dal 5% nel primo anno al 16% del quarto anno. La riduzione nella circolazione di MRSA si accompagna all'aumento di MSSA perché questi ultimi probabilmente vanno ad occupare le nicchie ecologiche precedentemente occupate dai ceppi meticillino resistenti.

I ceppi MSSA isolati presso gli asili nido sono stati anch'essi sottoposti a tipizzazione molecolare e 5 isolati sono stati identificati come ST22-MSSA *spa t223*. Ulteriori indagini

sulle sequenze nucleotidiche sono ancora in corso per chiarire la correlazione con i rispettivi ceppi ST22-MRSA *spa t223*.

Tra i campioni alimentari ed animali la presenza di MSSA non deve essere sottovalutata; ceppi MRSA come CC398 possono originarsi da ceppi MSSA umani che solo in un secondo momento presso gli animali da allevamento acquisiscono la resistenza alla meticillina, alla tetraciclina, allo zinco e altri metalli pesanti generalmente contenuti nei mangimi animali (44).

Concludendo la sorveglianza sulla circolazione di MRSA e MSSA è uno strumento estremamente utile per conoscere l'epidemiologia locale ed in particolare il rischio correlato alla catena alimentare, in ambiente ospedaliero e nella popolazione generale. Solo attraverso la raccolta di questi dati è possibile stimare l'entità del problema e conoscere le dinamiche di circolazione dei ceppi. Nel nostro caso al basso rischio correlato alla catena alimentare si associa l'importante circolazione di MRSA in ospedale e in comunità. In entrambi questi contesti, il principale ceppo circolante è identificato come CC22-MRSA IV *tst1+/ UK-EMRSA-15* "Middle Eastern Variant".

L'epidemiologia dei ceppi MRSA è in costante evoluzione. Lo stravasamento di ceppi ospedalieri in comunità e viceversa è un fenomeno molto frequente negli ultimi anni. In questo contesto, la strategia più efficace è proprio quella della sorveglianza perché consente di conoscere i ceppi circolanti, le loro caratteristiche in termini di antibiotico resistenze e, di seguito quando necessario, poter intraprendere misure di controllo in tempi brevi.

## BIBLIOGRAFIA

1. La Placa, Principi di Microbiologia Medica, Società Editrice Esculapio, Decima Ed.
2. Dinges, Martin M., Paul M. Orwin, and Patrick M. Schlievert. "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*." *Clinical microbiology reviews* 13.1 (2000): 16-34.
3. Todd, JAMES K. "Toxic shock syndrome." *Clinical microbiology reviews* 1.4 (1988): 432-446.
4. Lindsay, Jodi A., et al. "The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*." *Molecular microbiology* 29.2 (1998): 527-543.
5. Lindsay, Jodi A., et al. "Shuffling of mobile genetic elements (MGEs) in successful healthcare-associated MRSA (HA-MRSA)." *Mobile genetic elements* 2.5 (2012): 239-243.
6. Di Giannatale, Elisabetta, et al. "Caratterizzazione di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da alimenti destinati all'uomo." *Veterinaria Italiana* 47.2 (2011): 155-164.
7. Le Loir, Yves, Florence Baron, and Michel Gautier. "*Staphylococcus aureus* and food poisoning." *Genet Mol Res* 2.1 (2003): 63-76.
8. Goerke, Christiane, et al. "*Staphylococcus aureus* strain designation by agr and cap polymorphism typing and delineation of agr diversification by sequence analysis." *International journal of medical microbiology* 295.2 (2005): 67-75.
9. Gilot, Philippe, et al. "Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis." *Journal of clinical microbiology* 40.11 (2002): 4060-4067.
10. Stefani, Stefania, et al. "Pathotype and susceptibility profile of a community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain responsible for a case of severe pneumonia." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 63.1 (2009): 100-104.
11. Lina, Gerard, et al. "Involvement of Panton-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia." *Clinical Infectious Diseases* 29.5 (1999): 1128-1132.
12. Peacock, Sharon J., Ishani de Silva, and Franklin D. Lowy. "What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?." *Trends in microbiology* 9.12 (2001): 605-610.



13. Fuda, Cosimo, et al. "The basis for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of Biological Chemistry* 279.39 (2004): 40802-40806.
14. Ito, T., et al. "International working group on the classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC): Classification of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements." *Antimicrob Agents Chemother* 53 (2009): 4961-4967.
15. Turlej, A. G. A. T. A., W. A. L. E. R. I. A. Hryniewicz, and J. O. A. N. N. A. Empel. "Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview." *Pol J Microbiol* 60.2 (2011): 95-103.
16. Moellering, Robert C. "MRSA: the first half century." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 67.1 (2012): 4-11.
17. Köck, Robin, et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe." *Euro Surveill* 15.41 (2010): 19688.
18. Johnson, Alan P. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 66.suppl 4 (2011): iv43-iv48.
19. Pantosti, Annalisa, and Maria Del Grosso. "LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN ITALIA E IN EUROPA." *ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ* 9 (2009): 6.
20. Kuehnert, Matthew J., et al. "Methicillin-resistant–*Staphylococcus aureus* Hospitalizations, United States." *Emerging infectious diseases* 11.6 (2005): 468.
21. Klevens, R. Monina, et al. "Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992–2003." *Clinical infectious diseases* 42.3 (2006): 389-391.
22. Coello, R., et al. "Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA." *Journal of Hospital Infection* 37.1 (1997): 39-46.
23. Clements, Archie, et al. "Overcrowding and understaffing in modern health-care systems: key determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission." *The Lancet infectious diseases* 8.7 (2008): 427-434.
24. Lindsay, Jodi A. "Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance—What have we learned from genomics?." *International Journal of Medical Microbiology* (2013).
25. Boucher, Helen W., and G. Ralph Corey. "Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clinical infectious diseases* 46.Supplement 5 (2008): S344-S349.

26. Pantosti, A., and M. Venditti. "What is MRSA?." *European Respiratory Journal* 34.5 (2009): 1190-1196.
27. Popovich, Kyle J., Robert A. Weinstein, and Bala Hota. "Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains?." *Clinical Infectious Diseases* 46.6 (2008): 787-794.
28. Knight, Gwenan M., et al. "Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67.10 (2012): 2514-2522.
29. Baldan, Rossella, et al. "Factors contributing to epidemic MRSA clones replacement in a hospital setting." *PloS one* 7.8 (2012): e43153.
30. Campanile, Floriana, et al. "Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy." *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 8.1 (2009): 22.
31. EFSA European Food Safety Authority, Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods, Adopted on 5 March 2009, *The EFSA Journal* 2009, 993, 1-73;
32. Voss A. et al. Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen, the Netherlands, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming, *Emerging Infectious Diseases* 2005,11, 1965-66;
33. Laurence Armand Lefevre, Raimond Ruimy, Antoine Andremont, groupe Hospedialier Bichat-Claude Bernard, Paris, France, Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isoletes from healty pig farmers, human controls and pigs, *Emerging Infectious Diseases* 2005, vol 11 , n° 5, 711-714;
34. Corina C. P. M. Bens, Andreas Voss, Cornè H. W. Klaassen, Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen, the Netherlands, Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isoletes associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis, *Jurnal of Clinical Microbiology*,May 2006, 1875-1876;
35. T.Khanna, R.Friendship, C.Dewey, J.S.Weese, University of Guelph, Guelph, Canada, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and figs farmers, *Veterinary Microbiology* 2007, 10;
36. Olivier Denis, Carl Suetens, Marie Hallin, Boudewijn Catry, Lise Ramboer, Marc Dispas, Glenda Willems, Bart Gordts, Patrick Butaye, Marc J.Struelens, Methicillin

- resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium, *Emerging Infectious Diseases* 2009, vol 15, n°7, 1098-1101;
37. Haitske Graveland, Jaap A. Wagenaar, Hans Heesterbeek, Dik Mevius, Engeline van Duijkeren, Dick Heederik, , Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene, *PloS one*, June 2010, vol 10, issue 6;
  38. Christiane Cuny, Rolf Nathaus, Franziska Layer, Birgit Strommenger, Doris Altmann, Wolfgang Witte, Nasal colonization of human with Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs, *PloS one*, August 2009, vol 4, issue 8;
  39. Xander W. Huijsdens, Beatrix J. van Dijke, Emile Spalburg, Marga G. van Santem-Verheuevel, Max EOC Heck, Gerdiline N. Pluister, Andreas Voss, Wim J. B. Wannet, Albet J. de Neeling, Community-acquired MRSA and pig farming, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006, 5, 26;
  40. M. Wulf and A. Voss, MRSA in livestock animals – an epidemic waiting to happen ?, *Clinical Microbiology and Infectious Disease* 2008, 14, 519-521;
  41. Angelo Pan, Antonio Battisti, Alessia Zoncada, Francesco Bernieri, Massimo Boldini, Alessia Franco, Maurilio Giorgi, Manuela Iurescia, Silvia Lorenzotti, Mario Martinotti, Monica Monaci, Annalisa Pantosti, Community-acquired Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy, *Emerging Infectious Diseases* 2009, vol 15 , n°5, 845-846;
  42. Laura Soavi, Roberto Stellini, Liana Signorini, Benvenuto Antonini, Palmino Pedroni, Livio Zanetti, Bruno Milanesi, Annalisa Pantosti, Alberto Mattelli, Angelo Pan, Giampiero Carosi, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398, Italy, *Emerging Infectious Diseases* 2010, vol 16 , n°2, 346-347;
  43. M. Wulf, A. Markestein, F.T. van der Linden, A. Voss, C. Klaassen, C. M. Verduin, First outbreak of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007, *Euro Surveill* 2008, 13;
  44. Price, Lance B., et al. "Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock." *MBio* 3.1 (2012).
  45. Kari Grave, Jordi Torren-Edo and David Mackay, Comparison of sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65:2037-2040;

46. Pantosti, Annalisa. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health." *Frontiers in microbiology* 3 (2012).
47. Battisti, A., et al. "Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings." *Veterinary microbiology* 142.3 (2010): 361-366.
48. Van Loo, Inge HM, et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands." *Emerging infectious diseases* 13.11 (2007): 1753.
49. De Boer, E., et al. "Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat." *International journal of food microbiology* 134.1 (2009): 52-56.
50. Tenhagen, B. A., et al. "Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) in the pork food chain in Germany." *PROCEEDINGS BOOK*.
51. Bhargava, Kanika, et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA." *Emerging infectious diseases* 17.6 (2011): 1135.
52. Weese, J. Scott, et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of retail pork." *The Canadian Veterinary Journal* 181.7 (2010): 749.
53. Weese, J. S., B. P. Avery, and R. J. Reid-Smith. "Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products." *Letters in applied microbiology* 51.3 (2010): 338-342.
54. Pu, Shuaihua, Feifei Han, and Beilei Ge. "Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats." *Applied and environmental microbiology* 75.1 (2009): 265-267.
55. Mole, Beth. "MRSA: Farming up trouble." *Nature* 499.7459 (2013): 398-400.
56. Fetsch Alexandra, Kraushaar Britta, Krause Gladys, Guerra-Roman Beatriz, Alt Katja, Hammerel, Jens-Andrè, Kasbohrer Annemarie, Braeunin Juliane, Appel Bernd, Tenhagen Bernd-Alois; Methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* from farm to fork impact on food safety; *Tehnologija mes* 52 (2011) 1, 60-65;
57. Köck, Robin, et al. "The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany." *Deutsches Ärzteblatt International* 108.45 (2011): 761.
58. Wattering, Lilian, et al. "Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 31.4 (2012): 455-464.
59. Stefani, Stefania, et al. "Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods." *International journal of antimicrobial agents* 39.4 (2012): 273-282.

60. Trindade, P. A., et al. "Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7.1 (2003): 32-43.
61. Sabat, Artur, et al. "New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates." *Journal of clinical microbiology* 41.4 (2003): 1801-1804.
62. Milheiriço, Catarina, Duarte C. Oliveira, and Hermínia de Lencastre. "Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51.9 (2007): 3374-3377.
63. Robinson, D. A., and M. C. Enright. "Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clinical microbiology and infection* 10.2 (2004): 92-97.
64. Enright, Mark C., et al. "Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*." *Journal of clinical microbiology* 38.3 (2000): 1008-1015.
65. Tang, Yi-Wei, et al. "Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of clinical microbiology* 38.4 (2000): 1347-1351.
66. Shopsin, B., et al. "Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains." *Journal of Clinical Microbiology* 37.11 (1999): 3556-3563.
67. Frenay, H. M., et al. "Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism." *Journal of clinical microbiology* 32.3 (1994): 846-847.
68. Shukla, Sanjay K., et al. "Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates." *Journal of clinical microbiology* 48.10 (2010): 3582-3592.
69. Price, J. R., et al. "Whole genome sequencing in the prevention and control of *Staphylococcus aureus* infection." *Journal of Hospital Infection* (2012).
70. Kuroda, Makoto, et al. "Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *The Lancet* 357.9264 (2001): 1225-1240.
71. Monecke, Stefan, et al. "A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *PloS one* 6.4 (2011): e17936.

72. Holden, Matthew TG, et al. "A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic." *Genome research* 23.4 (2013): 653-664.
73. Harris, Simon R., et al. "Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread." *Science* 327.5964 (2010): 469-474.
74. Nübel, Ulrich, et al. "MRSA transmission on a neonatal intensive care unit: epidemiological and genome-based phylogenetic analyses." *PloS one* 8.1 (2013): e54898.
75. Gesualdo, Francesco; Bongiorno, Dafne; Rizzo, Caterina; Bella, Antonino; Menichella, Donato ; Stefani, Stefania; Tozzi, Alberto; MRSA Nasal Colonization in Children: Prevalence Meta-analysis, Review of Risk Factors and Molecular Genetics; *Pediatric Infectious Disease Journal*; May 2013 - Volume 32 - Issue 5 - p 479–485, doi: 10.1097/INF.0b013e3182864e4c
76. Daniel J. Wolter, Archana Chatterjee, Meera Varman and Richard V. Goering, *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46(10):3548. DOI:10.1128/JCM.00985-08
77. Biber, Asaf, et al. "A typical hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone is widespread in the community in the Gaza strip." *PloS one* 7.8 (2012): e42864.
78. Monecke, Stefan, et al. "Characterisation of MRSA strains isolated from patients in a hospital in Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia." *BMC microbiology* 12.1 (2012): 146.