

La frequenza dei VRE è aumentata considerevolmente negli anni: tra gli enterococchi isolati dal sangue negli USA è passata da 0% nel 1989 al 27.5% nel 2002.

In Europa, fino agli anni 90, i VRE sono stati isolati soprattutto da animali da allevamento e da portatori sani a livello intestinale.

Questo differente quadro è stato attribuito da una parte al minore uso di vancomicina in ambito ospedaliero, dall'altro dall'ampia utilizzazione dell'avoparcina, un antibiotico analogo alla vancomicina, come promotore di crescita nell'allevamento avicolo e suinicolo fino al 1997.

La presenza di VRE nelle feci di polli e suini e nei prodotti carnei derivati è stata documentata anche in Italia: la frequenza di isolamento si è ridotta dopo il bando dell'avoparcina da parte dell'Unione Europea, ma non si è azzerata. Per quanto riguarda la situazione delle infezioni da VRE in ambito umano, in Italia negli anni 90 sono stati descritti rari casi sporadici e alcuni focolai nosocomiali.

Nel 1995 la proporzione di VRE tra gli enterococchi isolati da infezioni in uno studio multicentrico era del 7%, con un range da 0 al 36% a seconda degli ospedali. Nel corso della sorveglianza dell'antibiotico-resistenza AR-ISS (2001-2002) è emersa una quota importante di VRE tra i ceppi isolati da sangue: 18% per la specie *E.faecium*.

Anche se una sovrastima dovuta alla segnalazione più attenta di ceppi "problematici" non può essere esclusa, questo dato è in accordo con il 19% di infezioni da VRE in Italia secondo uno studio europeo sui reparti a rischio, e appare decisamente superiore alla media degli isolamenti di VRE *E.faecium* da sangue nella maggior parte dei paesi europei (<10%) riportata dall'EARSS per il 2002.

Studi di tipizzazione molecolare hanno permesso di riconoscere un gruppo clonale di *E.faecium* portatore del gene *vanA*, che conferisce alta resistenza a vancomicina e teicoplanina, circolante in ospedali localizzati in diverse aree geografiche italiane.

Questo clone ha caratteristiche simili a quelle del clone epidemico più diffuso negli ospedali degli Stati Uniti: resistenza a beta-lattamici e aminoglicosidi e presenza del gene *esp*, marcatore di diffusività nosocomiale.

Dal momento che i ceppi di *E.faecium vanA*-positivi di provenienza animale sono risultati spesso sensibili a beta-lattamici e aminoglicosidi, e sempre *esp*-negativi, appare poco probabile un trasferimento diretto dagli animali di ceppi VRE causa di infezioni gravi nell'uomo.

S4.3

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTE: CARATTERISTICHE, EVOLUZIONE E IPOTESI PER IL FUTURO

Stefani S.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche -
Università degli Studi di Catania

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) in relazione al numero di fattori di virulenza, alle strategie patogenetiche e alla capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in svariati ambienti, risulta essere uno dei microrganismi più "flessibili" fra i patogeni nosocomiali, con recenti e preoccupanti isolamenti in ambito comunitario. Gli MRSA hanno subito una forte spinta evolutiva, mediata principalmente dall'accumulo di geni di resistenza in seguito all'uso di un numero sempre maggiore di agenti antimicrobici, ma nessun altro determinante come l'acquisizione della resistenza alla meticillina, ha consentito di attribuire a questi microrganismi una "individualità" caratteristica nell'ambito della specie *S.aureus*.

Nonostante l'acquisizione esogena di *mecA* e la sua potenziale mobilità, gli MRSA presentano una struttura di popolazione principalmente clonale: evidenze recenti hanno fatto ipotizzare che il locus *mec* sia localizzato in un ristretto gruppo di MRSA strettamente correlati tra loro e la loro fitness elevata possa derivare dal background genetico di cloni virulenti di MSSA nei quali il locus stesso possa essersi integrato a livello cromosomico, evolvendo successivamente nei diversi cloni - circa 5 distribuiti in tutto il mondo - maggiormente adattatisi nel tempo.

MecA risulta parte di un elemento genetico mobile chiamato Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC*mec*), paragonabile ad una isola di patogenicità, con la sostituzione di geni di antibiotico-resistenza anziché di virulenza. Sono stati identificati quattro tipi di SCC*mec*, che in ordine di isolamento del ceppo di riferimento sono: i) SCC*mec* type I (34 Kb) identificato nel primo ceppo di MRSA isolato nel 1961 in UK; ii) SCC*mec* type II (52 Kb) identificato in un ceppo di MRSA isolato nel 1982 in Giappone; iii) SCC*mec* type III (66 Kb) identificato in un ceppo di MRSA isolato nel 1985 in Nuova Zelanda; iv) SCC*mec* type IV (20-24 Kb) identificato in un ceppo di MRSA comunitario. Per rispondere alle domande sulla genetica di popolazione di *S.aureus*, l'analisi di sequenze nucleotidiche ed in particolare di sette geni house-keeping coinvolti nel metabolismo batterico, si è rivelata uno strumento flessibile e potente. Questa tecnica, Multi-Locus-Sequence Typing (MLST), in quanto basata sulla lenta evoluzione del "core" genomico, fornisce dei dati alta-

mente significativi sia per uno studio epidemiologico dei principali cloni, sia per studi di tassonomia e filogenesi.

L'applicazione delle metodiche classiche di tipizzazione molecolare (PFGE::*ClaI-mecA*::*ClaI*-Tn554), insieme ai dati della MLST, elaborati mediante l'algoritmo BURST e alla caratterizzazione delle diverse SCC*mec*, hanno permesso al nostro gruppo di ricerca di intraprendere uno studio sulle correlazioni genetiche degli MRSA diffusi in Italia, predire il genotipo ancestrale dal quale discendono attualmente due dei cloni maggiormente diffusi, "Romano" e "Italiano" e stabilire le relazioni evolutive che intercorrono tra questi rispetto ai cloni di *S.aureus* più diffusi in ambito internazionale.

Dai nostri risultati è emerso che il clone Romano ha subito, negli anni, un'evoluzione consistente nell'acquisizione di due copie del Tn554 e nell'integrazione del plasmide pUB110 a valle del gene *mecA* (passaggio dal clonal-type II::NH::C a I::J::C); questi eventi di ricombinazione hanno portato alla modificazione di SCC*mec*-type da I a IA e l'acquisizione di nuovi determinanti di resistenza ha reso questa nuova variante resistente a eritromicina, spectinomicina e clindamicina e con bassi livelli di sensibilità ai glicopeptidi.

Tali ceppi mantengono inalterato il loro sequence type ST247 (3-3-1-12-4-4-16), PFGE-type (C) ed appartengono al *agr* type I. Al contrario, gli isolati appartenenti al clone Italiano mostrano invariate negli anni, le loro caratteristiche fenotipiche (sensibilità a tetraciclina e rifampicina) e genotipiche (clonal-type II::E::E; ST228: 1-4-1-4-12-24-29; SCC*mec* I e *agr* type II), suggerendo l'immediato successo ottenuto da questi ceppi, nell'ambiente.

Attraverso la correlazione con i principali cloni diffusi in ambito internazionale è emerso che gli MRSA appartenenti a questi due cloni si evolvono secondo due linee evolutive differenti.

Gli isolati appartenenti al clone "Romano" hanno subito eventi di ricombinazione recenti, ma derivano dallo stesso progenitore dei cloni "Arcaico", "Iberico" e "Brasiliano".

Mentre, il background genetico del clone "Italiano", correlato a quello di ceppi di *S.aureus* con diverse caratteristiche (MSSA, MRSA e GISA), conferma l'ipotesi del trasferimento orizzontale di *mecA* tra differenti lineages ancestrali.

Il cambiamento della epidemiologia di *S.aureus* meticillino-resistente è certamente un aspetto molto preoccupante, che unito alla sempre maggiore insensibilità agli antibiotici (allarmante è la recente acquisizione del gene *vanA*), richiede studi sempre più approfonditi al fine di rispondere a quesiti tuttora aperti.

La pressione selettiva degli antibiotici è certamente responsabile della disseminazione di cloni resistenti: un uso corretto degli antibiotici potrebbe evitare almeno l'aumento indiscriminato nella prevalenza.

S4.4

GRAM-NEGATIVI E NUOVE β -LATTAMASI

Rossolini G.M.

Dipartimento di Biologia Molecolare,
Laboratorio di Fisiologia e Biotecnologia dei Microrganismi,
Università di Siena

Dati recenti di sorveglianza epidemiologica indicano che i batteri Gram-negativi multiresistenti stanno riemergendo in modo significativo come causa di infezioni nosocomiali. Tra i patogeni Gram-negativi, i principali problemi di chemioresistenza si incontrano attualmente nelle *Enterobacteriaceae*, in *Pseudomonas aeruginosa* ed in altri Gram-negativi nonfermentanti, e possono riguardare tutte le principali classi di farmaci antimicrobici.

Riguardo agli antibiotici β -lattamici, che sono i farmaci più utilizzati per la terapia delle infezioni da Gram-negativi, i più importanti problemi di resistenze emergenti sono quelli a carico delle cefalosporine a spettro esteso e dei carbapenemi, e il principale meccanismo di resistenza acquisita a questi farmaci è rappresentato dalla produzione di enzimi degradativi (β -lattamasi), anche se i difetti di permeabilità e i sistemi di efflusso attivo possono contribuire in maniera rilevante, soprattutto in alcune specie.

Nelle *Enterobacteriaceae* i problemi di resistenza ai β -lattamici riguardano principalmente le cefalosporine a spettro esteso, e interessano anche quelle specie (ad es. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*) che non sono capaci di dare origine a mutanti resistenti iperproduttori di una β -lattamasi endogena di classe molecolare C. Tra gli enzimi acquisiti più frequentemente responsabili di questo fenotipo di resistenza figurano le cosiddette β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) di classe A, che idrolizzano le cefalosporine a spettro esteso e i monobattami, ma non le cefamicine o i carbapenemi. Si tratta più spesso di varianti degli enzimi TEM-1/2 o SHV-1, a codificazione plasmidica, che hanno evoluto la capacità di idrolizzare questi composti a seguito di mutazioni puntiformi. Tuttavia possono anche essere coinvolti enzimi di natura diversa, alcuni dei quali presentano una notevole prevalenza in certe aree geografiche (es. le ESBL di tipo CTX-M). Più rara per il momento è la presenza di carbapenemasi a serina (di classe molecolare A o D) e di carbapenemasi a zinco (classe molecolare B), e di β -lattamasi di classe C a codificazione plasmidica. In *P. aeruginosa* i problemi di resistenza riguardano tutti i β -lattamici anti-pseudomonas, compresi i carbapenemi. In questa specie il repertorio degli enzimi emergenti è ampio e include varie ESBL di classe A (di natura generalmente diversa dai derivati