



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

(Direttore Prof. Alessandro Casini)

Tesi di Specializzazione:

**DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITA' ANTIBIOTICA
DEI PRINCIPALI PATOGENI RESPONSABILI
DELLE INFEZIONI POLMONARI
IN PAZIENTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Carlo Garzelli

Candidata:

Dott.ssa Francesca Antonia Borgia

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
INTRODUZIONE	pag. 2
GENETICA DELLA FIBROSI CISTICA	pag. 4
INFEZIONI POLMONARI	pag. 6
- HAEMOPHILUS INFLUENZAE	pag. 7
- STAPHYLOCOCCUS AUREUS	pag. 8
- PSEUDOMONAS AERUGINOSA	pag. 11
- BURKHOLDERIA CEPACIA	pag. 14
- STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA	pag. 14
- ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS	pag. 15
- INFEZIONI FUNGINEE	pag. 16
OBIETTIVO DELLA TESI	pag. 17
MATERIALI E METODI	pag. 18
RISULTATI	pag. 23
CONCLUSIONI	pag. 33
BIBLIOGRAFIA	pag. 36

RIASSUNTO

La Fibrosi Cistica o mucoviscidosi è una malattia ereditaria a carattere autosomico recessivo che si presenta con un quadro clinico molto vario: ipersalinità del sudore, insufficienza pancreatica esocrina e grave e progressiva broncopneumopatia cronica.

La caratteristica peculiare della malattia a livello broncopolmonare è costituita da infezioni polimicrobiche bronchiali recidivanti di difficile eradicazione.

I germi responsabili delle infezioni croniche sono *Stafilococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e ceppi patogeni emergenti quali *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e Stafilococchi meticillino-resistenti.

Lo scopo della tesi è stato quello di isolare i principali ceppi patogeni in pazienti affetti da Fibrosi Cistica e di valutarne le sensibilità antibiotiche. L'analisi è stata effettuata su campioni di pazienti fibrocistici pervenuti presso la sezione di Microbiologia dell'Ospedale "Misericordia" di Grosseto durante il periodo .01/01/2007-31/07/2010.

I dati locali ottenuti rispecchiano l'epidemiologia nazionale ed internazionale sia per quanto riguarda i tipi di ceppi patogeni isolati sia per la loro frequenza, ad esclusione della percentuale di isolamenti di *Staphylococcus aureus* e dei ceppi MRSA che nella nostra realtà locale sono risultati percentualmente inferiori rispetto ai dati di letteratura nazionale ed internazionale. Questa differenza può essere imputata al minore numero di campioni locali analizzati rispetto alla casistica studiata a livello internazionale. Anche i risultati locali relativi all'andamento delle sensibilità antibiotiche sono apparsi compatibili con quanto citato in letteratura sull'argomento. La sola discrepanza che si è osservata è stata l'elevata resistenza del ceppo rugoso di *P. aeruginosa* verso la tobramicina che secondo i dati riportati dalla letteratura viene considerato un farmaco di eccellenza nella terapia antibiotica contro le infezioni polmonari sostenute da *P. aeruginosa* in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. È comunque importante considerare che negli ultimi anni è stato osservato un incremento della resistenza di *P. aeruginosa* verso la tobramicina e per questo motivo la terapia antibiotica che viene considerata più efficace è l'associazione della tobramicina con la ciprofloxacina. Inoltre è necessario considerare che la sensibilità o la resistenza in vitro possono essere differenti dall'efficacia reale di un farmaco in vivo.

INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica o mucoviscidosi è la malattia congenita multisistemica più frequente nella popolazione caucasica che si manifesta con un quadro clinico che comprende ipersalinità del sudore, insufficienza pancreatica esocrina e grave e progressiva broncopneumopatia cronica.[1]

La sua incidenza è 1 su 2.500/2.700 nati vivi, la malattia viene ereditata con carattere autosomico recessivo e la frequenza dei portatori sani è di circa 1 ogni 20-25 individui sani.[2]

La Fibrosi Cistica è causata da mutazioni nel gene che codifica per una proteina chiamata CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) costituita da 1480 aminoacidi, localizzata nella membrana apicale delle cellule degli epitelii e che è responsabile della regolazione del trasporto elettrolitico delle ghiandole a secrezione esocrina. Queste mutazioni provocano un difetto funzionale della proteina CFTR che si traduce nell'assenza o nella diminuita permeabilità della membrana apicale delle cellule epiteliali verso il cloro. Questo difetto causa uno squilibrio ionico che colpisce tutte le ghiandole a secrezione esocrina di vari organi e apparati; nelle ghiandole sudoripare l'assente o diminuito riassorbimento di cloro e sodio dal versante luminale alla cellula causa una eccessiva salinità del sudore, mentre a livello dell'apparato respiratorio si ha una disidratazione dei secreti. [1] In condizioni normali infatti a livello delle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio il cloro viene escreto nel lume e il sodio ne è rimosso, il muco risulta quindi idratato e poco denso ed è in grado di intrappolare le particelle inalate allo scopo di farle poi eliminare dalle ciglia verso le prime vie aeree. Nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica il cloro non può essere rimosso dalla cellula e l'assorbimento di sodio risulta aumentato, il muco quindi risulta denso e di difficile rimozione favorendo la proliferazione di batteri ed il reclutamento di cellule immunitarie che, invece di favorire esclusivamente l'eliminazione dei microrganismi, danneggiano i tessuti liberando detriti sia dei batteri che delle cellule dell'apparato respiratorio che oltre ad aumentare la densità del muco hanno un'azione chemiotattica verso i neutrofili con conseguente ostruzione e danneggiamento delle vie aeree.

Il continuo alternarsi di infezioni, risposta infiammatoria e aumento delle secrezioni bronchiali è quindi alla base del danno polmonare.

La compromissione dell'apparato digerente è dovuta ad un'alta densità delle secrezioni enzimatiche del pancreas che provocano l'ostruzione dei dotti pancreatici che si traduce nel mal assorbimento di proteine e lipidi assunti con gli alimenti con conseguente riduzione dell'accrescimento ponderale.

La fibrosi cistica è una malattia ad interessamento multiorgano, infatti oltre all'apparato respiratorio e digerente viene colpito anche l'apparato riproduttivo; nell'uomo le manifestazioni cliniche più frequenti sono l'atresia dei dotti deferenti e l'azoospermia che portano sterilità nel 98% dei fibrocistici mentre il 25% delle donne affette da fibrosi cistica risulta sterile a causa dell'aumentata vischiosità del muco cervicale.

L'identificazione precoce della malattia è molto importante per mettere in atto un'adeguata terapia mirata ad evitare danni permanenti all'apparato respiratorio. La diagnosi precoce si effettua attraverso screening neonatale che si basa sul dosaggio, con metodica immunofluorescente (IRT), del tripsinogeno nel sangue prelevato in terza giornata di vita seguito da un secondo prelievo nel caso si rilevassero valori superiori al limite normale nel primo prelievo. La positività allo screening neonatale, anche al secondo prelievo, non determina in maniera sicura lo stato di malattia per Fibrosi Cistica, in tal caso quindi si esegue un accertamento diagnostico definitivo attraverso il test del sudore che consiste nel determinare la concentrazione di sodio e cloro nel sudore. Il metodo di riferimento è quello di Gibson e Cooke che si effettua attraverso stimolazione iontoforetica della parte volare dell'avambraccio con pilocarpina e misurazione della concentrazione di cloro. Normalmente, la quantità di cloro nel sudore è inferiore a 40 mEq/L, il test è positivo se i valori di cloro sono superiori a 60 mEq/L.

Grazie alla diagnosi precoce della malattia e all'innovazione delle cure, intese come introduzione di nuovi antibiotici, somministrazione di enzimi pancreatici sostitutivi e trapianti di polmone e fegato, si è assistito negli ultimi anni ad un netto miglioramento della qualità della vita dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica con una sopravvivenza media di 33 anni.[1]

GENETICA DELLA FIBROSI CISTICA

La Fibrosi Cistica è determinata dal difetto del gene CFTR che è stato identificato nel 1989 da Francis S. Collins, dell'Università del Michigan, e Lap-Chee Tsui e John R. Riordan, dell'Università di Toronto. Il gene CFTR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 (banda q31-32), è lungo 230 Kb ed è costituito da 27 esoni.

Il gene CFTR codifica per una proteina, la *Cystic Fibrosis Transmembrane-Conductance Regulator* (CFTR), che attraversa la membrana cellulare e svolge la funzione di un canale per il cloro. [3]

Ad oggi sono state identificate oltre 1.500 mutazioni del gene CFTR che hanno effetti differenti sulla proteina CFTR. Le mutazioni del gene CFTR possono essere suddivise in cinque classi; nelle mutazioni di classe I si ha la mancata produzione della proteina CFTR, di conseguenza sono assenti i canali del cloro sulla superficie cellulare, le mutazioni di classe II sono caratterizzate dalla produzione della proteina, la quale però non viene assemblata e viene quindi eliminata, nelle mutazioni di classe III la proteina viene prodotta e assemblata ma non è attiva in quanto sono assenti i fattori che regolano l'apertura e la chiusura del canale per il cloro, le mutazioni di classe IV presentano una diminuita funzionalità della proteina CFTR, nelle mutazioni di classe V si ha una ridotta sintesi della proteina, questo vuol dire che nelle mutazioni IV e V il cloro passa attraverso la cellula ma in quantità ridotta. [1]

La mutazione più frequente è la $\Delta F508$ che costituisce il 68% delle mutazioni che causano Fibrosi Cistica, consiste nella delezione di tre paia di basi (CTT) nell'esone 10, cioè nella delezione del residuo fenilalaninico a livello del codone 508. [Fig. n°1]

La prevalenza delle mutazioni è differente in relazione all'area geografica e alle diverse popolazioni, la mutazione $\Delta F508$ ad esempio è più frequente nell'Europa settentrionale (70%) mentre è meno frequente nell'America settentrionale (50%).[1,3]

La fibrosi cistica è una malattia genetica a carattere autosomico recessivo e questo vuol dire che la probabilità di una coppia portatrice sana della malattia di avere un figlio affetto da Fibrosi Cistica è del 25%, sano del 25% e portatore sano del 50%.

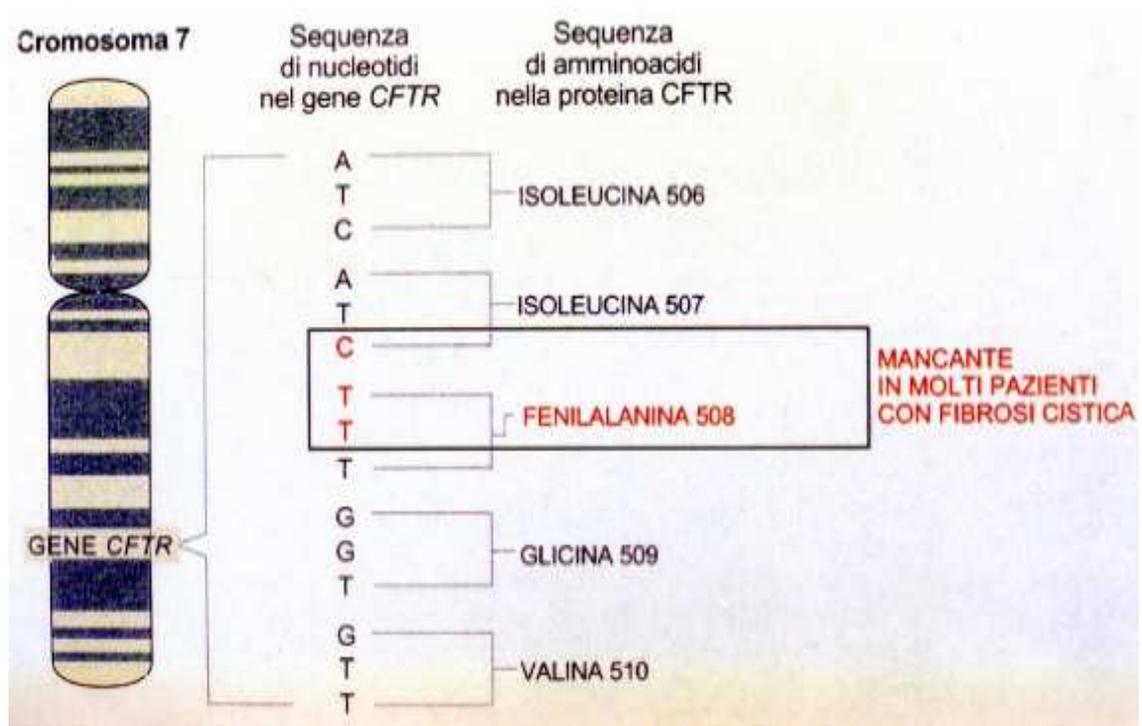


Figura n° 1

Mutazione $\Delta F508$, nella figura si può osservare la delezione di tre paia di basi (CTT) nell'esone 10 che consiste nella delezione del residuo fenilalaninico in posizione 508.

INFEZIONI POLMONARI

La funzionalità polmonare è compromessa in quasi tutti i pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Il danno polmonare è causato da infezioni bronchiali recidivanti che cronicizzano diventando responsabili dell'elevata mortalità dei pazienti affetti, infatti le infezioni ricorrenti sostenute da vari microrganismi diventano con il tempo di difficile eradicazione anche se trattate con terapie antibiotiche aggressive.[1]

La frequenza delle infezioni polmonari nei pazienti fibrocistici è dovuta al difetto della proteina CFTR che causa un'alterazione del trasporto dei sali (sodio e cloro) con aumento della viscosità del muco e conseguente compromissione della clearance mucociliare. La ridotta clearance mucociliare favorisce la colonizzazione batterica che, unitamente all'eccessiva risposta immunitaria, nel tempo danneggia la parete bronchiale con formazione di bronchiectasie, di dilatazioni cioè del lume bronchiale con sfiancamento della parete. Inizia così un circolo vizioso tra infezione ed infiammazione, il muco infatti ristagna a livello di queste dilatazioni, favorendo a sua volta il recidivare delle infezioni, il sistema immunitario dell'ospite non è in grado di eliminare l'infezione e nel tentativo di farlo provoca dei danni a livello del tessuto polmonare provocati dalla formazione di immunocomplessi e dall'eccessiva produzione di citochine come interleuchina-8.[4]

I sintomi più comuni sono tosse persistente, produttiva, con espettorazione densa, sinusiti croniche, poliposi nasale, bronchioliti, bronchiti e broncopolmoniti. Dai reperti radiologici si possono osservare, oltre ai processi infiammatori, iperinsufflazione di aria o zone di atelectasia estese. Le manifestazioni cliniche più gravi, che si osservano nelle fasi avanzate della malattia, sono l'insufficienza respiratoria o cardiorespiratoria irreversibile, pneumotorace e emottisi massiva. [1]

I primi batteri che colonizzano il polmone dei pazienti fibrocistici durante la prima decade di vita sono *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*, quest'ultimo diviene nel tempo il ceppo prevalente.[4]

L'aumento della durata media di vita e il continuo uso di antibiotici ha causato, negli ultimi anni, la comparsa di ceppi batterici sempre più resistenti e ceppi patogeni emergenti come *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e Stafilococchi meticillino-resistenti. [1,5]

Risulta quindi di notevole importanza nella pratica clinica isolare ed identificare le varie specie batteriche in campioni di pazienti fibrocistici e soprattutto determinare la resistenza agli antibiotici al fine di poter indirizzare in maniera specifica la terapia.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Haemophilus influenzae è, insieme a *S. aureus*, tra i primi batteri che colonizzano il polmone di pazienti fibrocistici.

H. influenzae è un bacillo Gram negativo, asporigeno, capsulato, aerobio facoltativo, immobile, fermentante e ossidasi positivo. *H. influenzae* può essere classificato in sei sierotipi (contrassegnati con le lettere dalla a alla f) in base alla differente composizione dei polisaccaridi capsulari. La più spiccata patogenicità è quasi esclusivamente associata al sierotipo b. Esiste anche una classificazione biochimica di *H. influenzae*, attraverso la quale si possono distinguere sette biotipi contrassegnati con i numeri romani da I a VII. Al biotipo I appartengono la quasi totalità dei ceppi responsabili di meningiti e laringiti ostruttive. [6]

Sebbene sia considerato un patogeno primario, *H. influenzae* si ritrova come flora normale delle vie aeree superiori e alcuni studi hanno confermato uno stato di portatore del 75% nei bambini al di sotto dei sette anni e del 35% negli adulti. Rimane incompresa la relazione tra lo stato di portatore e lo stato di malattia causato da questo microrganismo. Si suppone che la malattia possa insorgere a causa dell'assenza di anticorpi serici protettivi, diretti contro la capsula di *H. influenzae*. Per questo motivo l'infezione si verifica soprattutto nei bambini, che infatti non hanno ancora prodotto una quantità sufficiente di anticorpi.

I fattori di patogenicità di *H. influenzae* sono costituiti dalla capsula, dal lipopolisaccaride responsabile della produzione di una endotossina e da una proteina, un enzima extracellulare che degrada le immunoglobuline umane della classe IgA1. [7]

Dal punto di vista colturale *H. influenzae* è un batterio esigente e difficile da coltivare, cresce meglio in atmosfera umida, col 5-10% di CO², necessita di particolari fattori di crescita, fattore X o emina, una protoporfirina derivata dall'emoglobina e fattore V o nicotinamide-adenin-dinucleotide (NAD), detto anche coenzima I. [6]

Le infezioni sostenute da *H. influenzae* sono principalmente infezioni pediatriche, con la massima incidenza tra i 2 mesi e i 3 anni. Le manifestazioni patologiche causate da *H. influenzae* sono meningiti, laringiti ostruttive ma può anche causare setticemie con possibilità di polmoniti ed endocarditi.

Il trattamento farmacologico per combattere l'infezione causata da *H. influenzae* è costituito dalla somministrazione di ampicillina. Esistono però ceppi di *H. influenzae* resistenti a tale molecola, la resistenza è dovuta alla produzione di un enzima extracellulare, la β -lattamasi. Per i ceppi β -lattamasi positivi vengono impiegate quindi altre molecole antibiotiche come la cefalosporina o l'associazione di cloramfenicolo-ampicillina. [7]

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus. è un batterio Gram positivo, catalasi e coagulasi positivo, che si può isolare nelle secrezioni nasali del 10% degli individui sani nei quali non provoca infezioni. Nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica, soprattutto nella prima decade di vita, viene considerato il principale patogeno responsabile di infezioni a livello bronco-polmonare dove trova un habitat favorevole per replicarsi data l'elevata concentrazione di cloruro di sodio presente nelle secrezioni bronchiali.

Il danno a livello polmonare provocato da *S. aureus* è imputabile alla produzione da parte del batterio di tossine e di conseguenza all'attivazione del sistema immunitario che danneggia ulteriormente il tessuto creando un ambiente favorevole alla colonizzazione di *P. aeruginosa*.

La colonizzazione del polmone da parte di *S. aureus* è resa possibile anche grazie alla presenza sulla superficie del batterio di adesine che sono in grado di legarsi a recettori di membrana che si trovano a livello del tessuto polmonare.

Esistono inoltre ceppi di *S. aureus* mucosi, produttori di biofilm, che ha la funzione di proteggere il batterio contro l'azione di antibiotici e contro le difese immunitarie. Il biofilm è prodotto da un'adesina intracellulare polisaccaridica che favorisce l'adesione batterica.

Queste caratteristiche potrebbero essere responsabili della colonizzazione cronica da parte di *S. aureus* che si può protrarre anche per molti anni e della formazione di ceppi che

assumono aspetti morfologici in coltura completamente differenti dai ceppi wild-type di *S. aureus* denominate small colony variant (SCV).

Le SCV possono risultare di difficile identificazione in quanto al contrario dei ceppi wild-type di *S. aureus* le SCV crescono come colonie puntiformi, non emolitiche e non pigmentate in agar sangue, oppure possono essere a “uovo fritto” con bordi traslucidi e la parte centrale pigmentata, o come colonie dette “pin point” che sono circa 10 volte più piccole delle normali colonie di *S. aureus*. [Fig. n°2]

La continua assunzione di antibiotici e attivazione del sistema immunitario rendono il tessuto polmonare un ambiente ostile per *S. aureus*, per questo motivo vengono messi in atto, da parte del batterio dei meccanismi di difesa rappresentati appunto dalla produzione di ceppi *S. aureus*-SCV, i quali si introducono all'interno delle cellule allo scopo di proteggersi dall'azione del sistema immunitario e degli antibiotici ai quali infatti risultano maggiormente resistenti rispetto ai ceppi wild-type. La maggiore resistenza ai farmaci è data anche dal fatto che i ceppi SCV crescono molto lentamente rispetto ai ceppi wild-type e questo si ripercuote sull'attività di alcuni antibiotici come i beta-lattamici che risultano efficaci verso batteri a rapida crescita.

È stato dimostrato inoltre che il peggioramento delle condizioni cliniche dei soggetti affetti da Fibrosi Cistica può essere correlato da infezioni sostenute contemporaneamente da *S. aureus*-SCV e da *P. aeruginosa*. [8]

Negli ultimi anni si è osservato in pazienti affetti da Fibrosi Cistica un aumento di ceppi di *S. aureus* resistenti agli antibiotici, in particolare meticillina e flucloxacillina (MRSA). La responsabilità della meticillino resistenza è attribuibile ad una proteina, la *penicillin binding protein* a bassa affinità (PBP2a) codificata dal gene *mecA* che è costituito da un elemento genetico mobile molto variabile chiamato SCC*mec* (*staphylococcal chromosomal cassette*) che presenta i determinanti di resistenza per vari antibiotici.[10]

Nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica l'infezione persistente da *Staphylococcus* MRSA condiziona negativamente la funzionalità respiratoria, per questo motivo è di fondamentale importanza l'identificazione di questi ceppi.[9]

Esistono due differenti tipi di *Staphylococcus* MRSA, l'HA-MRSA di acquisizione ospedaliera e il CA-MRSA di acquisizione comunitaria. I ceppi HA-MRSA che sono responsabili di infezioni ospedaliere, presentano una notevole resistenza ai farmaci, quelli di acquisizione comunitaria rispetto ai ceppi di acquisizione ospedaliera presentano caratteristiche fenotipiche e genotipiche molto diverse; sono più sensibili agli antibiotici e

sono in grado di produrre una tossina citotossica e necrotizzante, la Panton-Valentine (PV) che è responsabile della virulenza del ceppo.

L'eradicazione delle infezioni sostenute da MRSA prevede l'impiego di clindamicina, minociclina. [10]

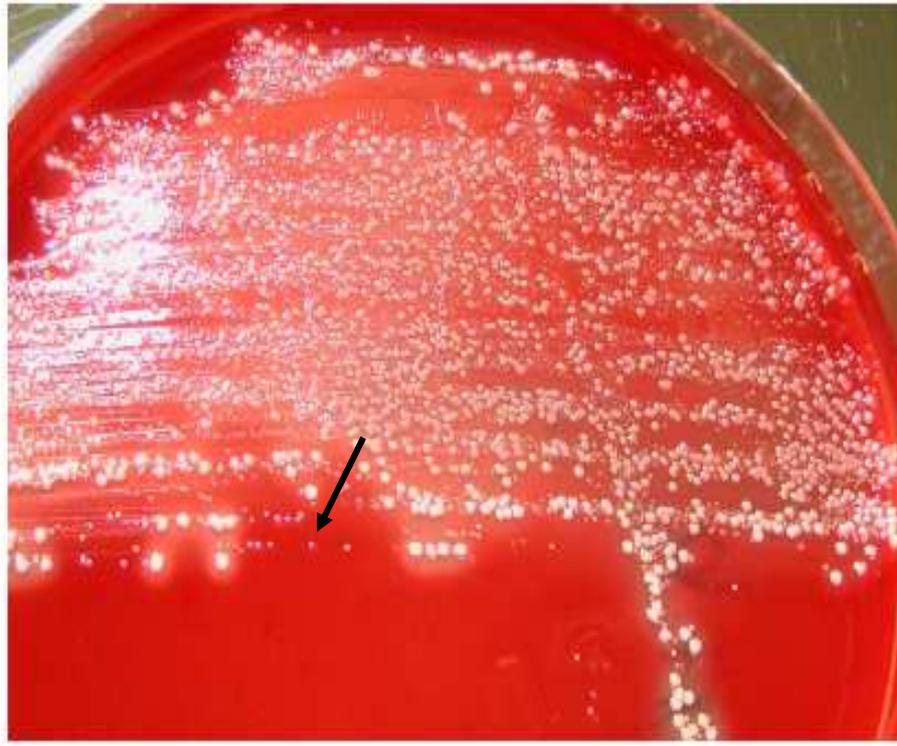


Figura n°2:

Colonie di *S. aureus* in agar sangue. Nella figura si può osservare la differenza tra le colonie di *S. aureus* ceppo wild-type che appaiono emolitiche e le SCV, indicate con la freccia, che crescono come colonie puntiformi, non emolitiche e non pigmentate in agar sangue.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa è un bacillo Gram negativo, asporigeno, aerobio obbligato, non fermentante, è un batterio ambientale che si ritrova nelle acque e nel suolo.

Nei soggetti sani si comporta come patogeno opportunisto provocando otiti, cistiti, infezioni oculari, setticemie e infezioni polmonari, inoltre svolge un ruolo importante nelle infezioni nosocomiali. Nei pazienti affetti da fibrosi cistica *P. aeruginosa* rappresenta il principale patogeno respiratorio, infatti in seguito ad una preesistente infiammazione, sostenuta da *S. aureus* ed unitamente alla incapacità del soggetto ad aumentare la clearance mucociliare, *P. aeruginosa* è in grado di colonizzare il polmone dapprima attraverso infezioni intermittenti ed in seguito in maniera cronica.

Durante l'infezione cronica *P. aeruginosa* mette in atto dei meccanismi di adattamento all'ambiente delle vie aeree in pazienti affetti da fibrosi cistica. Il processo di adattamento del batterio è dovuto ad un notevole riarrangiamento genetico con formazione di mutazioni responsabili della perdita della funzionalità di alcuni geni di *P. aeruginosa*. Questo fenomeno porta nel batterio alla perdita della motilità, la perdita di un componente (antigene O) del lipopolisaccaride (LPS) e la comparsa di varianti autotrofe.

In seguito a queste scoperte risulta di notevole importanza effettuare una terapia antibiotica aggressiva durante la prima fase di colonizzazione del batterio in modo tale da ridurre la possibilità di formazione di ceppi resistenti agli antibiotici. La resistenza agli antibiotici da parte di *P. aeruginosa* è determinata da vari meccanismi; alterazione del bersaglio contro il quale è diretto il farmaco, diminuito uptake, sviluppo di sistemi d'efflusso e inattivazione o modificazione del farmaco.

I meccanismi di resistenza agli antibiotici si distinguono in resistenze intrinseche o naturali e resistenze acquisite. La resistenza intrinseca è dovuta a caratteristiche morfologiche e fisiologia del batterio, quali la struttura della parete batterica, il meccanismo delle pompe d'efflusso e la formazione del biofilm. La resistenza acquisita agli antibiotici è inducibile ad alterazioni a livello del DNA di *P. aeruginosa* o ad altre alterazioni genetiche come il trasferimento, attraverso fenomeni di trasformazione, trasduzione o coniugazione, di componenti genetiche provenienti da altri batteri che presentano resistenza agli antibiotici. Il 10% delle resistenze acquisite sono causate da mutazioni cromosomiche che

determinano resistenza per un solo tipo di antibiotico. Durante le prime fasi di infezione il grado di resistenza è basso e può essere fronteggiato aumentando la dose dell'antibiotico. Le resistenze causate da mutazioni cromosomiche si dividono in resistenze multi-step se per ottenere un elevato grado di resistenza il batterio effettua una serie di mutazioni successive o one-step se è necessaria una sola mutazione per ottenere un buon grado di resistenza agli antibiotici come i chinolonici e la streptomicina.

Il 90% delle resistenze acquisite è dovuto al trasferimento di informazione genetica proveniente da altri batteri che possono appartenere alla stessa specie o a specie diverse. Questo tipo di resistenza permette a *P. aeruginosa* di risultare resistente a più molecole antibiotiche simultaneamente e al contrario del primo tipo di resistenza non può essere eluso neanche aumentando la dose degli antibiotici.

Le alterazioni cromosomiche che avvengono in *P. aeruginosa* e che sono responsabili della resistenza del batterio ai farmaci sono causate da mutazioni che permettono la secrezione di AmpC β -lattamasi, diminuiscono la produzione della porina OprD riducendo la sensibilità verso i carbapenemi, creano uno squilibrio nell'attività dei sistemi d'efflusso e provocano la produzione di topoisomerasi che determina la ridotta sensibilità ai chinolonici.

Le principali classi di farmaci utilizzate contro *P. aeruginosa* sono i β -lattamici, gli aminoglicosidi, i fluorochinolonici e le polimixine per ognuna delle quali *P. aeruginosa* possiede dei meccanismi di resistenza acquisita. La resistenza di *P. aeruginosa* ai β -lattamici è dovuta ad un aumento della produzione di AmpC β -lattamasi che causa appunto l'aumento della resistenza verso i β -lattamici come le penicilline, i cefemi e monobactami.

Esistono tre tipi diversi di β -lattamasi:

- Penicillasi a spettro-ristretto che agiscono contro le penicilline e le cefalosporine ma non sono attive verso i cefemi, i monobactami e i carbapenemi.
- β -lattamasi (ESBLs) che agiscono contro penicilline, cefemi, monobactami come l'aztreonam, ma non i carbapenemi come imipenem e meropenem.
- Metallo- β -lattamasi (MBL) che agiscono contro tutti i β -lattamici tranne i monobactami.

Gli enzimi degli ultimi due gruppi possiedono un ampio spettro d'azione e vengono isolati frequentemente in pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

La resistenza di *P. aeruginosa* verso l'imipenem e il meropenem è causata dalla ridotta produzione della porina OprD .

La produzione di enzimi alterati come l'adenililtrasferasi e le acetil-trasferasi, codificati da determinanti di resistenza acquisiti sono le principali cause della resistenza verso gli aminoglicoidi.

Le mutazioni che causano uno squilibrio nella regolazione dei sistemi d'efflusso e le mutazioni responsabili della formazione di topoisomerasi fanno sì che *P. aeruginosa* risulti resistente ai fluorochinolonici.

La colistina rimane uno dei pochi farmaci alla quale *P. aeruginosa* risulta sensibile, sono stati però isolati dei ceppi di *P. aeruginosa* che sono risultati resistenti alla colistina e si pensa che questo fenomeno sia imputabile ad una alterazione della struttura della membrana esterna.

P. aeruginosa presenta molti fattori di patogenicità come l'elastasi e la proteasi alcalina che danneggiano il tessuto polmonare e fattori di virulenza come la produzione di arginato che è in grado di inibire la fagocitosi e forma una barriera contro gli antibiotici. [11]

Il danno a livello polmonare non è imputabile solamente ai fattori di patogenicità e virulenza caratteristici di *P. aeruginosa* ma anche alla capacità che possiede *P. aeruginosa* di creare uno stato di infiammazione cronico dovuto ad una eccessiva risposta infiammatoria.[12]

Aspetto di notevole importanza è la capacità di *P. aeruginosa* di persistere a livello polmonare provocando uno stato di infiammazione cronica attraverso la produzione di *biofilm*. La formazione di *biofilm* si osserva solo durante l'infezione cronica sostenuta da *P. aeruginosa* mentre non si osserva durante le prime fasi di infezioni. Morfologicamente i ceppi produttori di *biofilm*, detti "mucoidi" presentano caratteristiche differenti dai ceppi "non mucoidi", cioè ceppi non produttori di *biofilm*; i primi si sviluppano come colonie mucose, i secondi come colonie di tipo rugoso. I ceppi mucoidi di *P. aeruginosa* inoltre presentano una maggiore resistenza antibiotica rispetto ai ceppi non mucoidi ed è per questo che è di fondamentale importanza eradicare *P. aeruginosa* durante le prime fasi di infezioni, quando ancora non ha prodotto il *biofilm*. [13]

BURKHOLDERIA CEPACIA

Burkholderia cepacia è un bacillo Gram negativo, mobile, catalasi negativo e ossidasi positivo, isolabile da diverse fonti ambientali.

B. cepacia rappresenta uno dei principali patogeni emergenti responsabile delle infezioni polmonari in pazienti fibrocistici. Il suo isolamento viene correlato sempre più spesso, anche grazie ad un miglioramento delle tecniche di isolamento, ad un netto peggioramento della funzionalità polmonare nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica e viene quindi ritenuto responsabile dell'aumento della morbilità e quindi della mortalità di questi pazienti.

Sono state classificate nove specie geneticamente differenti di *B. cepacia*, le più importanti dal punto di vista della patogenicità e multiresistenza presentata verso gli antibiotici sono: *B. Multivorans* e *B. cenocepacia*. [14-16]

La capacità di questo batterio di causare infezioni di difficile eradicazione è data dal fatto che *B. cepacia* è in grado di entrare all'interno delle cellule dell'apparato respiratorio ed eludere la risposta infiammatoria, in particolar modo *B. cepacia* è in grado di sopravvivere all'interno dei macrofagi. *B. cepacia*, inoltre, potendo sopravvivere all'interno delle cellule, è in grado di resistere all'azione di tutti quegli antibiotici che non riescono a passare all'interno di esse. [5-16]

B. cepacia presenta quindi una elevata resistenza ai farmaci; in particolare risulta sempre resistente agli aminoglicosidi e a quasi tutti i β -lattamici mentre presenta sensibilità maggiori verso la piperacillina, il cotrimosazolo e il cloramfenicolo. [16]

STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA

Stenotrophomonas maltophilia è un batterio Gram negativo che può essere isolato da numerose fonti ambientali, in maniera particolare nell'acqua.

S. maltophilia è in grado di provocare infezioni soprattutto in quei pazienti in cui le difese immunitarie sono compromesse e negli ultimi anni vi è stato un notevole incremento di infezioni sostenute da questo batterio proprio in pazienti affetti da Fibrosi Cistica, i quali

possono infettarsi con *S.maltophilia* attraverso l'utilizzo di apparecchi per la terapia aerosolica non adeguatamente asciugati dopo l'uso.

La patogenesi dell'infezione sostenuta da *S.maltophilia* sembra dipendere dalla capacità che possiede questo batterio di aderire alle cellule del tessuto polmonare e introdursi all'interno di esse e consecutivamente attivare un'eccessiva risposta flogistica.

L'infezione sostenuta da *S.maltophilia* è solitamente di facile eradicazione, infatti questo tipo di batterio non tende a cronicizzarsi ed anche se presenta un'elevata resistenza ai più classici antibiotici impiegati contro le infezioni di *P. aeruginosa* come i carbapenemi ed in particolar modo per la ciprofloxacina, *S.maltophilia* presenta un buon grado di sensibilità ad un discreto numero di altri antibiotici come il Trimetoprim, al quale quasi tutti i ceppi di *S.maltophilia* risultano sensibili, alla levofloxacina e alla ticarcillina che presentano una buona percentuale di sensibilità.[16]

ACHROMOBACTER (ALCALIGENES) XYLOSOXIDANS

Achromobacter xylosoxidans, in passato chiamato *Alcaligenes xylosoxidans*, è un bacillo Gram negativo, ossidasi positivo, ubiquitario nell'ambiente, in particolar modo può essere isolato in varie fonti acquatiche.

A. xylosoxidans è un batterio patogeno opportunista che può causare infezioni in soggetti debilitati. Tra le infezioni più comuni determinate da questo batterio sono comprese le batteriemie e le meningiti.

Nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica l'incidenza delle infezioni sostenute da *A. xylosoxidans* non è elevata ma col tempo si sta assistendo ad un aumento sempre maggiore dell'isolamento di questo batterio, tanto da farlo ritenere un ceppo patogeno emergente nei pazienti fibrocistici.

A.xylosoxidans non è considerato un batterio resistente agli antibiotici come i principali patogeni responsabili di infezioni polmonari nei fibrocistici, infatti risulta spesso resistente alla Tobramicina e alla Ciprofloxacina, mentre si osservano ottime sensibilità verso il Ceftazidime, la Piperacillina, il Meropenem, l'Imipenem e la Levofloxacina .[16]

INFEZIONI FUNGINEE

Il frequente e prolungato utilizzo di antibiotici e corticosteroidi facilita la colonizzazione dell'apparato respiratorio da parte di numerosi funghi filamentosi.

Le infezioni funginee sono causate maggiormente da *Aspergillus fumigatus* e meno frequentemente da *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*.

Aspergillus fumigatus è un fungo ubiquitario in natura che si diffonde nell'ambiente attraverso la liberazione delle sue spore.

Nei pazienti con Fibrosi Cistica è responsabile dell'aspergillosi broncopolmonare allergica; i soggetti infettati dalle spore di *Aspergillus fumigatus* presentano una elevata ipersensibilità a livello delle vie aeree portando un progressivo peggioramento della capacità respiratoria. Se l'infezione non viene trattata rapidamente può cronicizzare verso la fibrosi polmonare.

La continua assunzione di antibiotici facilita, oltre le infezioni sostenute da *A. fumigatus* a infezioni ricorrenti sostenute da *Candida spp*, in particolare da *Candida albicans* che penetra nell'organismo attraverso le prime vie aeree. *C. albicans* cresce come colonie bianco-crema, di forma regolare, a margini netti, opache e di consistenza pastosa.

L'antimicotico che viene impiegato maggiormente nel trattamento di infezioni causate da *C. albicans* è l'itraconazolo mentre può risultare resistente al fluconazolo.[17]

OBIETTIVO DELLA TESI

Obiettivo della tesi è quello di fornire un quadro generale sull'andamento delle sensibilità alle principali molecole antibiotiche utilizzate nel trattamento di infezioni sostenute dai principali ceppi batterici riscontrati in campioni provenienti da pazienti affetti da Fibrosi Cistica, pervenuti presso la sezione di Microbiologia dell'Ospedale "Misericordia" di Grosseto nel periodo .01/01/2007-31/07/2010.

MATERIALI E METODI

La metodica di riferimento per ottenere campioni che riflettano la flora patogena polmonare è l'analisi del lavaggio broncoalveolare. Il lavaggio broncoalveolare presenta alcuni limiti; è una metodica invasiva che può essere eseguita solamente in sedazione e per questo è poco tollerata dai pazienti. Nel lavaggio broncoalveolare inoltre viene analizzato un solo segmento polmonare e quindi non vi è la certezza di isolare tutti i ceppi batterici responsabili delle infezioni polmonari. Questo problema può essere risolto attraverso la raccolta dell'escreato che però può essere effettuato solamente da pazienti che sono in grado di espettorare. I bambini, soprattutto quelli molto piccoli, ad esempio non sono in grado di espettorare, a fronte di questo problema si può eseguire il tampone faringeo. [18] Per valutare l'andamento dell'infezione è consigliabile eseguire con regolare cadenza, almeno trimestrale, gli esami colturali.

I campioni di espettorato o i broncoaspirati devono essere consegnati il più presto possibile in laboratorio, qualora non sia possibile devono essere conservati a 4°C. Data la particolare viscosità delle secrezioni bronchiali dei pazienti fibrocistici è necessario fluidificare l'espettorato attraverso l'uso di omogenizzatori e mucolitici come il ditiotreitolo o l'acetilcisteina.

Oltre all'identificazione dei ceppi responsabili delle infezioni polmonari è necessario determinare la carica batterica per indirizzare il medico verso una terapia antibiotica mirata. Secondo le linee guida è sufficiente dare una indicazione semiquantitativa della carica batterica. La tecnica semiquantitativa che dovrebbe essere messa in pratica da tutti i laboratori è stata ideata dal Professor Høiby nel Centro Danese Fibrosi Cistica e prevede di diluire il campione 1:1 con ditiotreitolo e lasciato per 60 minuti a temperatura ambiente o per 30 minuti in termostato a 35/37°C. Il campione viene poi seminato utilizzando la tecnica delle "tre zone", si depositano 20 µl del campione sulle piastre e strisciando con un movimento a zig-zag cinque linee avanti e cinque linee indietro su ciascun quadrante, girando ogni volta la piastra di un angolo di 90 gradi. Lo scopo di questa tecnica è di diluire sufficientemente l'inoculo sulla superficie dell'agar, in modo da ottenere colonie batteriche ben isolate e di permettere di standardizzare la valutazione della carica batterica. [Fig. n°3]. La carica batterica viene determinata contando il numero di colonie per ciascun

quadrante; una crescita inferiore a 10 colonie nel primo quadrante viene valutata come 1.000 UFC/ml, una crescita superiore a 10 colonie nel primo quadrante e inferiore a 10 colonie nel secondo quadrante viene valutata come 10.000 UFC/ml, una crescita maggiore di 10 colonie nel primo quadrante, maggiore di 10 colonie nel secondo quadrante e inferiore a 10 colonie nel terzo quadrante viene valutata come 100.000 UFC/ml, infine una crescita maggiore di 10 colonie nel primo quadrante, maggiore di 10 colonie nel secondo quadrante e maggiore di 10 colonie nel terzo quadrante viene valutata come 1.000.000 UFC/ml.

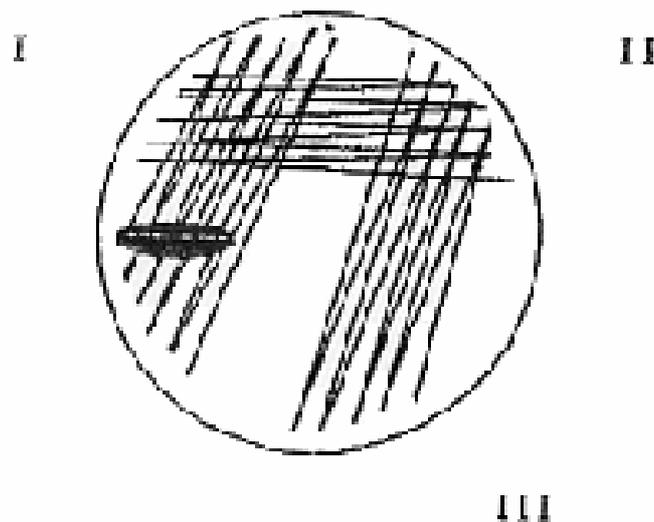


Figura n°3:

Tecnica delle “tre zone” impiegata per la determinazione semiquantitativa della carica batterica.

Allo scopo di poter isolare tutti i ceppi batterici che potrebbero essere presenti nel campione da analizzare è necessario impiegare vari terreni con caratteristiche differenti:

- **Agar sangue**: nel quale si sviluppano sia batteri Gram positivi che Gram negativi, viene impiegato soprattutto per isolare lo *Streptococcus pneumoniae* le cui colonie crescono con una tipica forma a pedina solo in terreni al sangue in atmosfera con il 5% di CO₂.
- **Agar CNA**: nel quale si sviluppano cocchi Gram positivi, catalasi negativi come *S. pneumoniae* che mantiene la sua tipica forma a pedina e *Streptococcus pyogenes* che cresce con colonie tonde ed emolitiche. Anche questo terreno viene incubato in CO₂.
- **Agar cioccolato con bacitracina**: impiegato per l'isolamento di *H. influenzae* che cresce con colonie tonde, bianche, traslucide, non cerosi.
- **Agar sale mannite**: impiegato per evidenziare *S. aureus* che essendo in grado di fermentare la mannite fa virare il colore del terreno da rosa a giallo.
- **Agar MacConkey**: nel quale si sviluppano tutti batteri Gram negativi
- **Agar BCSA**: è un terreno selettivo e differenziale indispensabile per l'isolamento di *B. cepacia* in quanto negli altri terreni questo batterio, avendo la caratteristica di crescere molto lentamente, potrebbe essere coperto dalla crescita di altri batteri come *P. aeruginosa*.
- **Agar sabouraud addizionato con cloramfenicolo**: per l'isolamento di *Candida spp* che cresce con colonie tonde, bianche e pastose e per l'isolamento di funghi.

Tutti i terreni, una volta seminati, vengono incubati nelle opportune atmosfere a 37°C per 24 ore, al termine delle quali viene effettuata una prima osservazione, le piastre vengono poi incubate nuovamente a 37° per altri quattro giorni per dare l'opportunità a batteri a lenta crescita di svilupparsi.[19]

In seguito all'incubazione vengono osservate le colonie che sono cresciute nei diversi terreni e i ceppi ritenuti patogeni vengono identificati mediante sistemi automatizzati (Vitek Systems).

I ceppi batterici patogeni che provocano infezioni sono molto esigenti dal punto di vista metabolico e per questo motivo per identificarli sono necessarie un elevato numero di prove biochimiche che sono inserite all'interno di sistemi multitest, costituiti da specifici

terreni di coltura, attraverso i quali si possono individuare specifici biotipi o sequenze di caratteristiche biochimiche specifiche per ciascun batterio. In presenza dei vari substrati il batterio analizzato produce dei metaboliti con conseguente variazioni di colore che vengono registrate attraverso un fotometro.

I risultati ottenuti vengono trasferiti ad un computer che elabora un codice numerico che identifica il batterio in esame. [20]

Il tempo che impiega lo strumento ad identificare i batteri varia da un minimo di 3-4 ore ad un massimo di 18-24 ore per i batteri a lenta crescita.

È comunque necessario confrontare i risultati ottenuti con il sistema automatizzato con l'osservazione microscopica dopo colorazione di Gram, con l'osservazione delle colonie che sono cresciute nei vari terreni e con i test biochimici come la catalasi l'ossidasi e la coagulasi.

Dopo aver identificato il ceppo patogeno si effettua l'antibiogramma. Per quanto riguarda i ceppi di *P.aeruginosa* è necessario distinguere i due morfotipi "rugoso" e mucoide" ed effettuare gli antibiogrammi separatamente in quanto questi ceppi presentano, oltre ad una differente morfologia anche una diversa sensibilità agli antibiotici.

La sensibilità agli antibiotici viene valutata attraverso la metodica Kirby-Bauer, tecnica manuale di diffusione in agar di antibiotici contenuti in specifici dischetti. La tecnica si effettua inoculando 0.5 McFarland della sospensione batterica in piastre di Mueller Hinton agar senza sangue, le piastre vengono poi incubate a 37° per 24 ore al termine delle quali vengono misurati gli aloni di inibizione che vengono interpretati secondo le tabelle pubblicate dal CLSI. [Fig. n°4]

Per i batteri Gram positivi vengono testati i seguenti antibiotici:

- AMINOGLICOSIDI: netilmicina, tobramicina, gentamicina, amikacina
- β-LATTAMICI: amoxicillina/ac.clavulanico, oxacillina, cefaclor, cefuroxime, ceftazidime, ticarcillina/clavulanato
- CHINOLONICI: ciprofloxacina, levofloxacina
- ALTRI: eritromicina, vancomicina, teicoplanina, linezolid, rifampicina, cotrimossazolo

Per i batteri Gram negativi vengono testati i seguenti antibiotici:

- AMINOGLICOSIDI: netilmicina, tobramicina, gentamicina, amikacina
- β -LATTAMICI: imipenem, piperacillina, ticarcillina/clavulanato, ceftazidime, aztreonam, cefepime, meropenem
- CHINOLONICI: ciprofloxacina, levofloxacina
- ALTRI: cotrimossazolo, rifampicina, cloramfenicolo, minociclina. [19]

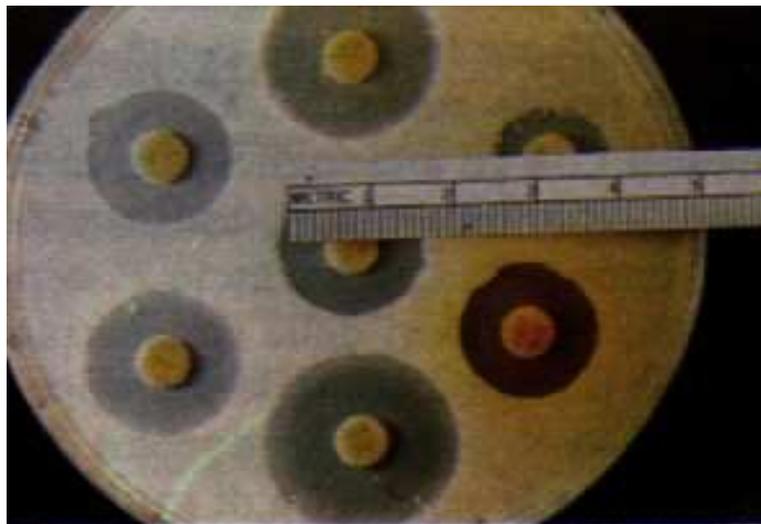


Figura n° 4:

Metodica Kirby-Bauer: la misura del diametro dell'alone permette di valutare la sensibilità o la resistenza del ceppo analizzato verso uno specifico antibiotico.

RISULTATI

Durante il periodo 01/01/2007-31/07/2010 sono state isolate nel laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale "Misericordia" di Grosseto 573 specie batteriche provenienti da campioni di 496 pazienti affetti da Fibrosi Cistica. In questo periodo si è riscontrato che le principali infezioni provocate in questi pazienti sono causate da *P. aeruginosa*, infatti su un totale di 573 isolati batterici sono stati riscontrati 306 ceppi (53%) di *P. aeruginosa*, di cui 130 (23%) appartenenti al morfotipo mucoide e 176 (31%) al morfotipo rugoso. È stato riscontrato che l'infezione più ricorrente dopo quella causata da *P. aeruginosa* è quella sostenuta da *S. aureus*. Nel grafico n° 1 si può osservare che su 573 ceppi isolati 109 (19%) sono rappresentati da *S. aureus*. L'isolamento di *H. influenzae* è stato osservato in una percentuale inferiore di pazienti, infatti si sono identificati 56 ceppi (10%) di *H. influenzae* su 573 isolati batterici riscontrati. Infezioni causate da *S. malthophilia*, e *C. albicans* sono risultate meno ricorrenti, infatti *S. malthophilia* è stata isolata in 53 campioni (9%) e *C. albicans* in 32 campioni (6%). Ancora meno frequenti sono state le infezioni sostenute da *A. xylosoxidans* evidenziata in 16 campioni (3%) e da *B. cepacia* riscontrata in un solo paziente (0,2%).

Dopo aver isolato i ceppi batterici, sono state studiate le sensibilità e le resistenze per ogni ceppo alle principali molecole antibiotiche.

Per entrambi i morfotipi di *P. aeruginosa* sono state osservate le diverse sensibilità alle seguenti molecole antibiotiche: TOBRAMICINA, AZTREONAM, IMIPENEM, GENTAMICINA e COLISTINA.

Per potere rappresentare schematicamente i risultati analitici, i ceppi analizzati sono stati raggruppati in categorie, per ogni categoria sono state calcolate le percentuali di sensibilità e resistenza alle varie molecole.

Nel grafico n°2 sono state riportate le percentuali di sensibilità riguardo gli antibiotici analizzati. Per quanto riguarda la Tobramicina si può osservare che dei 176 ceppi di *P. aeruginosa*, morfotipo rugoso, 82 ceppi (47%) presentavano resistenza all'antibiotico e 94 ceppi (53%) presentavano sensibilità a questo tipo di molecola. Nel morfotipo mucoide invece su 130 ceppi la resistenza alla Tobramicina è stata riscontrata in 45 ceppi (35%) mentre la sensibilità a questo farmaco è stata osservata in 85 ceppi (65%).

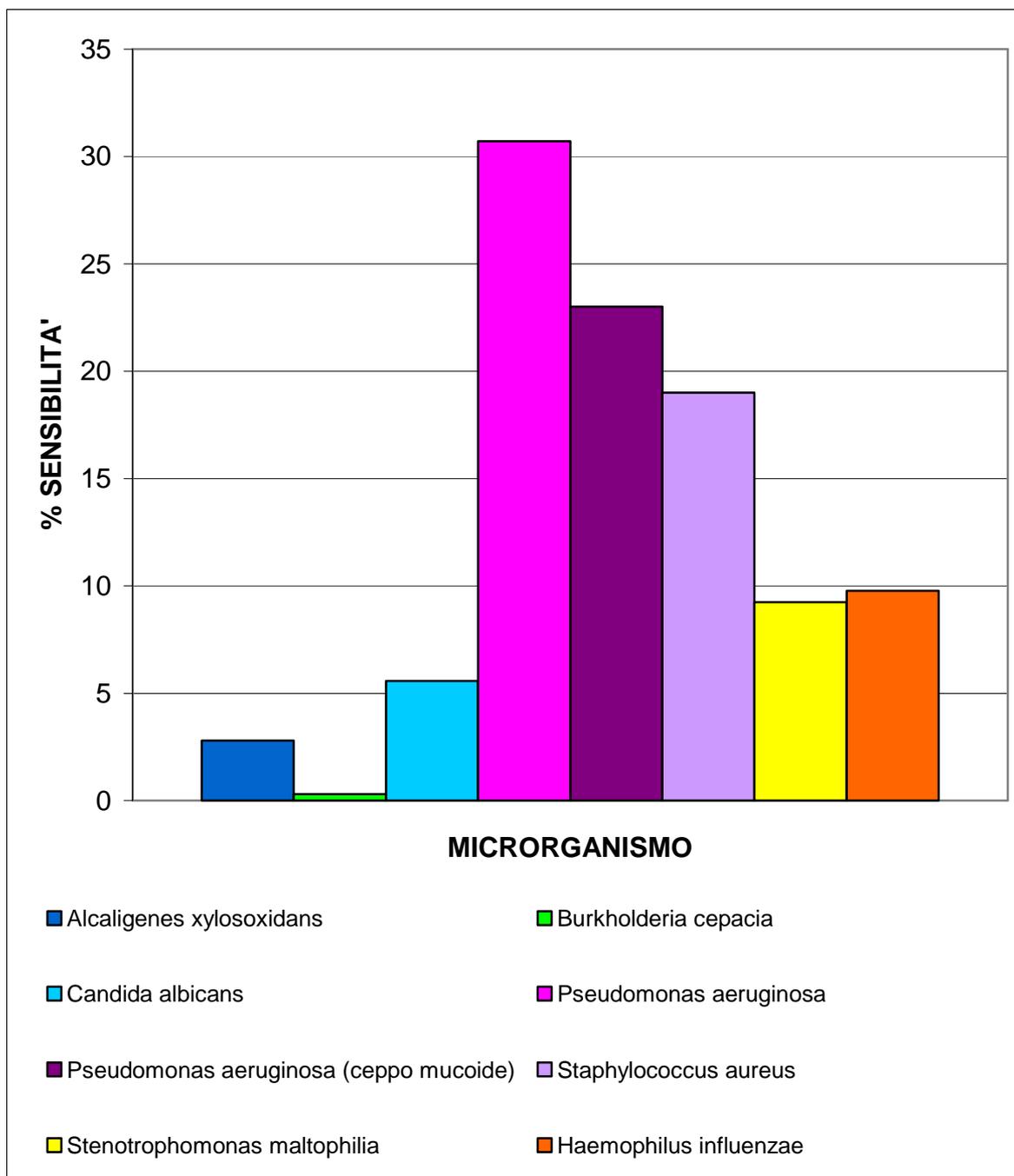


Grafico n°1:

Percentuale di microrganismi isolati durante il periodo 01/01/2007-31/07/2010 in 496 pazienti affetti da Fibrosi Cistica

Nello stesso grafico sono state considerate le sensibilità di entrambi i morfotipi per la molecola Aztreonam; è stato osservato che per il morfotipo rugoso, su 176 ceppi, 31 (18%) presentavano resistenza e 145 (82%) presentavano sensibilità al farmaco. Per il morfotipo mucoide, su 130 ceppi, 38 (29%) apparivano resistenti all'Aztreonam e 92 (71%) apparivano sensibili.

Osservando la sensibilità di *P. aeruginosa* verso la molecola antibiotica Imipenem 29 ceppi (16%) dei 176 appartenenti al morfotipo rugoso sono risultati resistenti e 147 ceppi (84%) sensibili a tale molecola. Tra i ceppi di *P. aeruginosa*, morfotipo mucoide, 36 ceppi sono risultati resistenti (28%) e 94 ceppi (72%) sensibili.

Nel grafico n°2 è stata rappresentata la sensibilità della Gentamicina relativa a *P. aeruginosa*. La Gentamicina per il morfotipo rugoso su 176 ceppi è risultata resistente in 120 ceppi (68%) e sensibile in 56 ceppi (32%). Per il morfotipo mucoide è stata riscontrata resistenza alla Gentamicina in 83 ceppi su 130 (64%) mentre la sensibilità a questo farmaco è stata osservata in 47 ceppi su 130 (36%).

I dati più significativi si sono tenuti valutando la sensibilità riguardo a *P. aeruginosa* con la Colistina. Tutti i ceppi di *P. aeruginosa*, sia il morfotipo rugoso che quello mucoide, presentano sensibilità a tale farmaco e nessun ceppo è risultato resistente alla Colistina.

Per i ceppi di *S. aureus* sono state analizzate la sensibilità e la resistenza alle principali molecole antibiotiche: TOBRAMICINA, GENTAMICINA, LEVOFLOXACINA e ERITROMICINA.

Nel grafico n°3 si possono osservare le percentuali di resistenza e sensibilità dei ceppi di *S. aureus* nei confronti della gentamicina. Il 47% dei ceppi analizzati (51 isolati) presentano sensibilità alla gentamicina e il 53% (58 isolati) resistenza alla stessa molecola.

Si è osservato che per quanto riguarda la tobramicina su 109 ceppi isolati 44 (40%) sono risultati sensibili a questa molecola e 65 ceppi (60%) resistenti.

Una spiccata differenza si è osservata analizzando la sensibilità di *S. aureus* alla levofloxacina. Si può infatti osservare che su 109 ceppi 91 (84%) sono risultati sensibili alla levofloxacina e solo 18 (16%) resistenti.

L'ultima molecola analizzata per *S. aureus* è stata l'eritromicina. Per questa molecola è stata evidenziata una quasi parità tra i ceppi risultari sensibili all'eritromicina, 53 isolati, cioè il 49%, contro il 51% (56 isolati) di resistenze osservate per la stessa molecola.

Dei 109 ceppi di *S. aureus* isolati 11 (10%) sono risultati meticillino resistenti (MRSA).

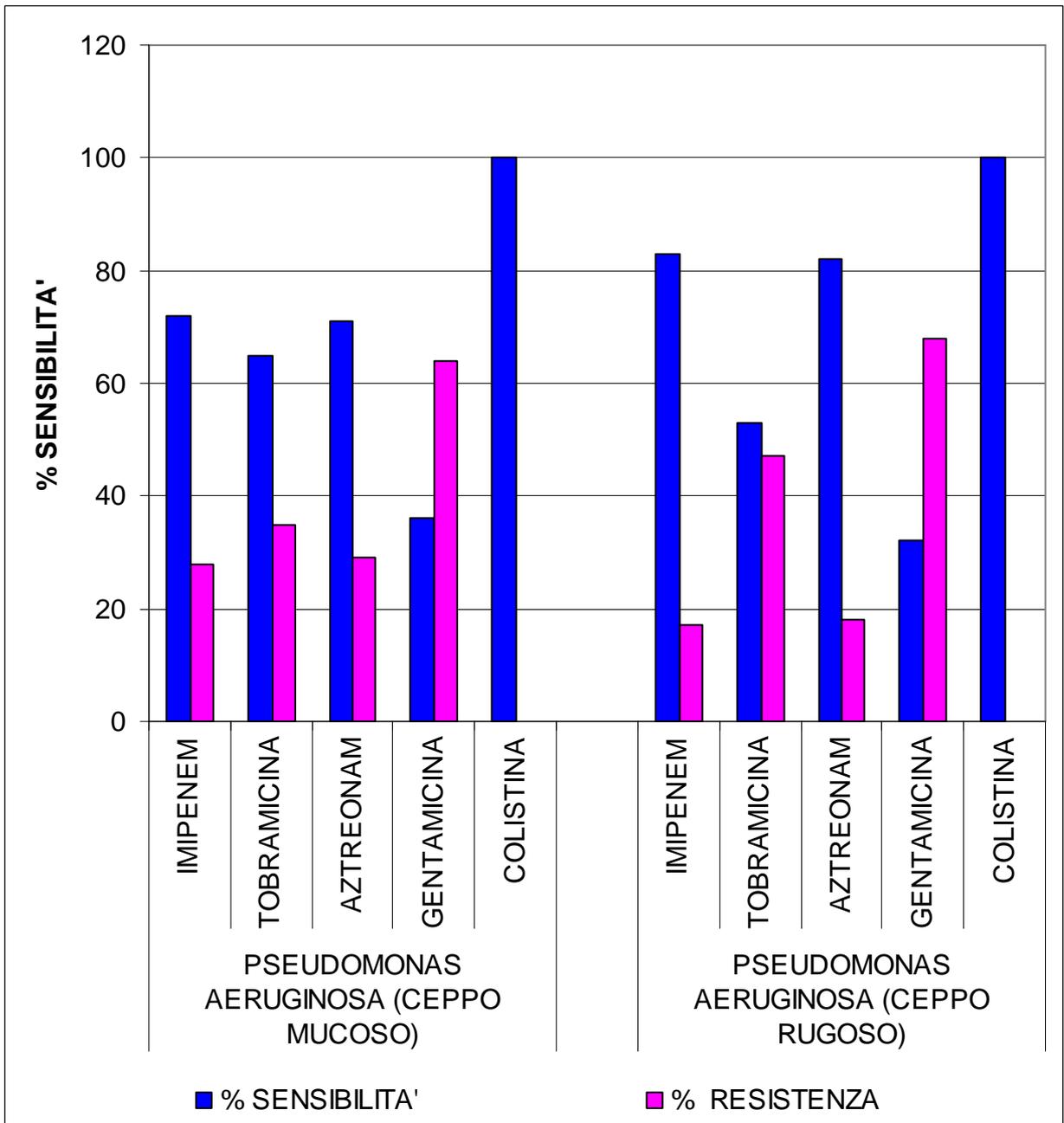


Grafico n° 2:

Percentuale di resistenza e sensibilità alle principali molecole antibiotiche impiegate nel trattamento di infezioni sostenute da *P. aeruginosa* ceppo mucoso e *P. aeruginosa* ceppo rugoso.

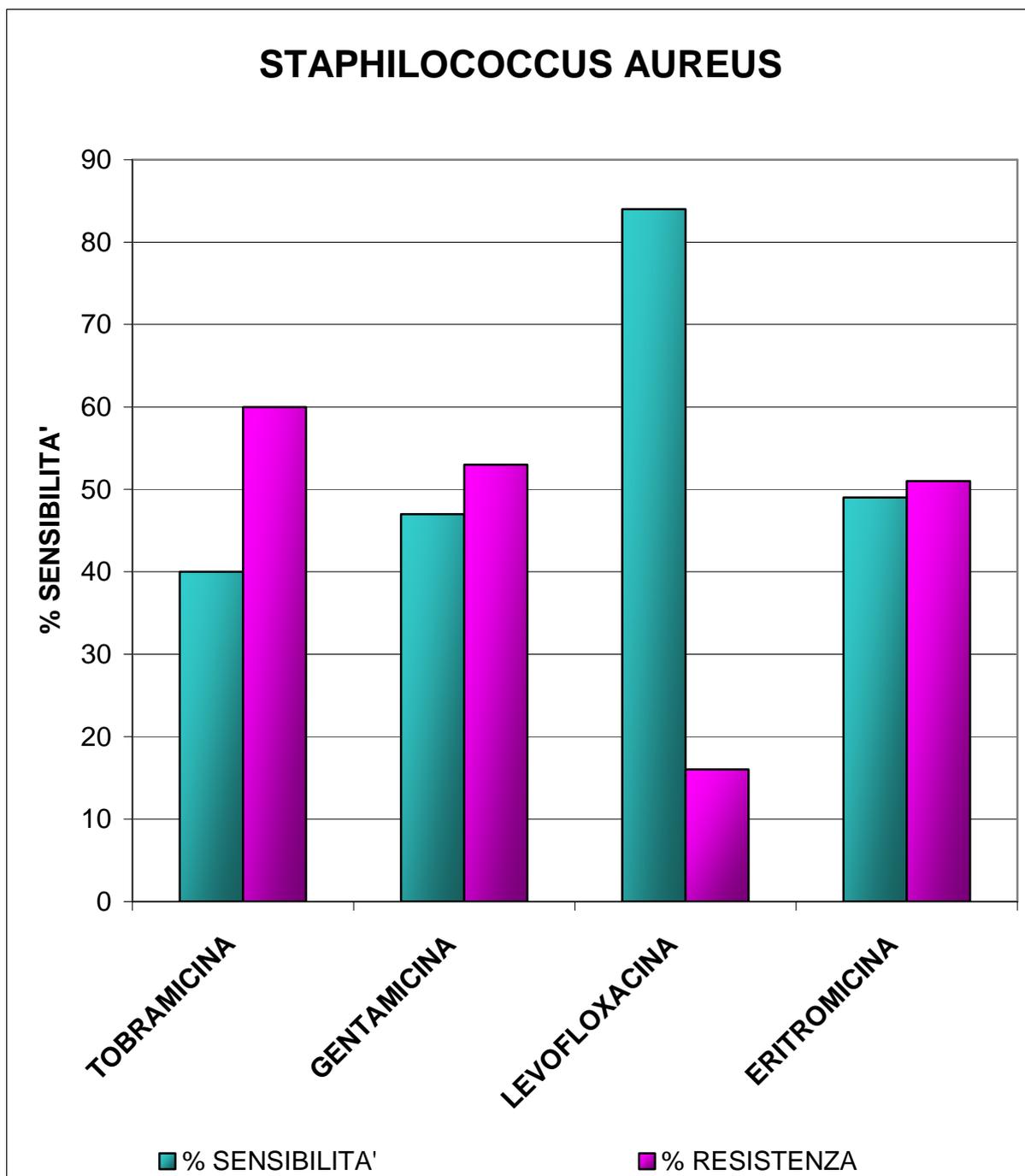


Grafico n°3:

Percentuale di resistenza e sensibilità alle principali molecole antibiotiche impiegate nel trattamento di infezioni sostenute da *S.aureus*.

Nel grafico n° 4 sono riportate le sensibilità e le resistenze delle principali molecole antibiotiche impiegate per combattere l'infezione sostenuta da *H. influenzae*. Le molecole antibiotiche saggiate sui 56 ceppi di *H. influenzae* isolati sono l'AMPICILLINA, il CLORAMFENICOLO, la TETRACICLINA, il COTRIMOSAZOLO, il CEFOTAXIME e la RIFAMPICINA.

Per quanto riguarda l'ampicillina 50 ceppi (89%) sono risultati sensibili contro 6 ceppi (11%) che sono risultati resistenti. 55 ceppi (98%) sono risultati sensibili per due molecole antibiotiche, il cloramfenicolo e la tetraciclina mentre solo 1 ceppo di *H. influenzae* (2%) ha mostrato resistenza alle due molecole.

Una percentuale maggiore di resistenza si è trovata verso il cotrimossazolo, 11 ceppi (80%) sono infatti resistenti alla molecola antibiotica e 45 (20%) sensibili. In tutti i 56 ceppi di *H. influenzae* è stata riscontrata la sensibilità verso il cefotaxime (100%), mentre per quanto riguarda la rifampicina in 52 ceppi (93%) è stata riscontrata la sensibilità e in 4 ceppi (7%) la resistenza.

Per *S. maltophilia* sono state studiate le sensibilità per solo tre molecole antibiotiche: LEVOFLOXACINA, MINOCICLINA, SXT. Nella maggior parte dei casi i ceppi di *S. maltophilia* sono risultati sensibili alle tre principali molecole antibiotiche. In particolare, per la levofloxacin è stata rivelata la sensibilità a questa molecola in 46 ceppi (87%) e la resistenza in 7 isolati (13%). La sensibilità alla minociclina è stata osservata in 50 isolati (94%) mentre la resistenza in soli 3 campioni (6%). Anche per l'SXT la sensibilità è stata riscontrata nella maggior parte dei ceppi di *S. maltophilia*, 48 ceppi (91%) contro 5 resistenze (9%). Grafico n° 5

Per *A. xylosoxidans* sono state analizzate le più frequenti molecole antibiotiche impiegate nella terapia di infezioni sostenute da questo batterio: CEFTAZIDIME, IMPENEM, PIPERACILLINA, CIPROFLOXACINA. È stato riscontrato che per il ceftazidime su 16 isolati di *A. xylosoxidans* 14 (88%) sono risultati sensibili a questa molecola e 2 (13%) resistenti. Grafico n°11.

L'osservazione della sensibilità di *A. xylosoxidans* all'imipenem e alla piperacillina ha rilevato lo stesso risultato; 15 isolati (94%) sono risultati sensibili alle due molecole antibiotiche e solo 1 (6%) resistente alle stesse molecole. Grafico n° 12. Infine per la ciprofloxacina 11 isolati (69%) hanno presentato resistenza alla molecola antibiotica e 5 (31%) sensibilità. Grafico n° 6.

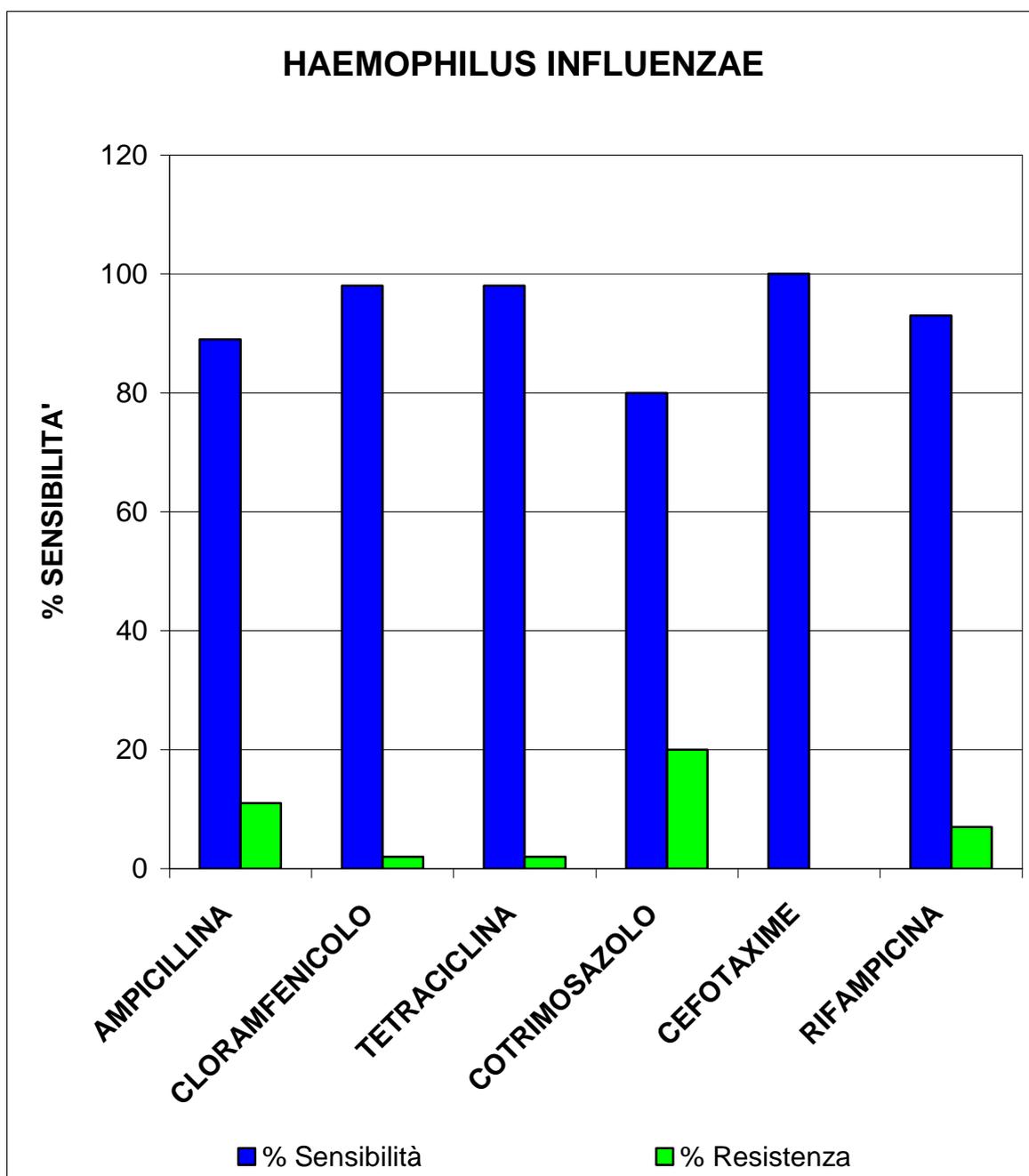


Grafico n°4:

Percentuale di resistenza e sensibilità alle principali molecole antibiotiche impiegate nel trattamento di infezioni sostenute da *H.influenzae*.

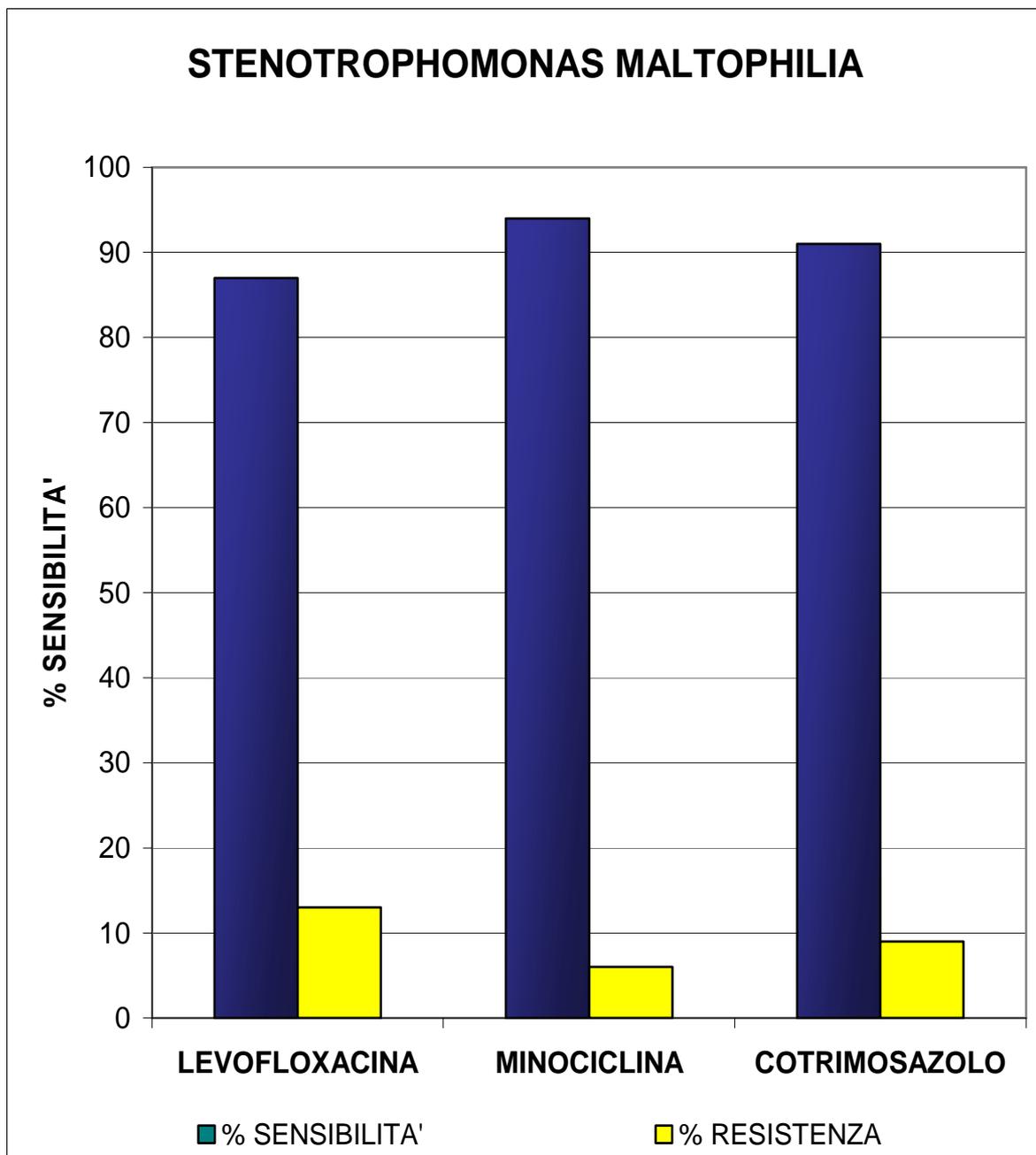


Grafico n° 5:

Percentuale di resistenza e sensibilità alle principali molecole antibiotiche impiegate nel trattamento di infezioni sostenute da *S. maltophilia*.

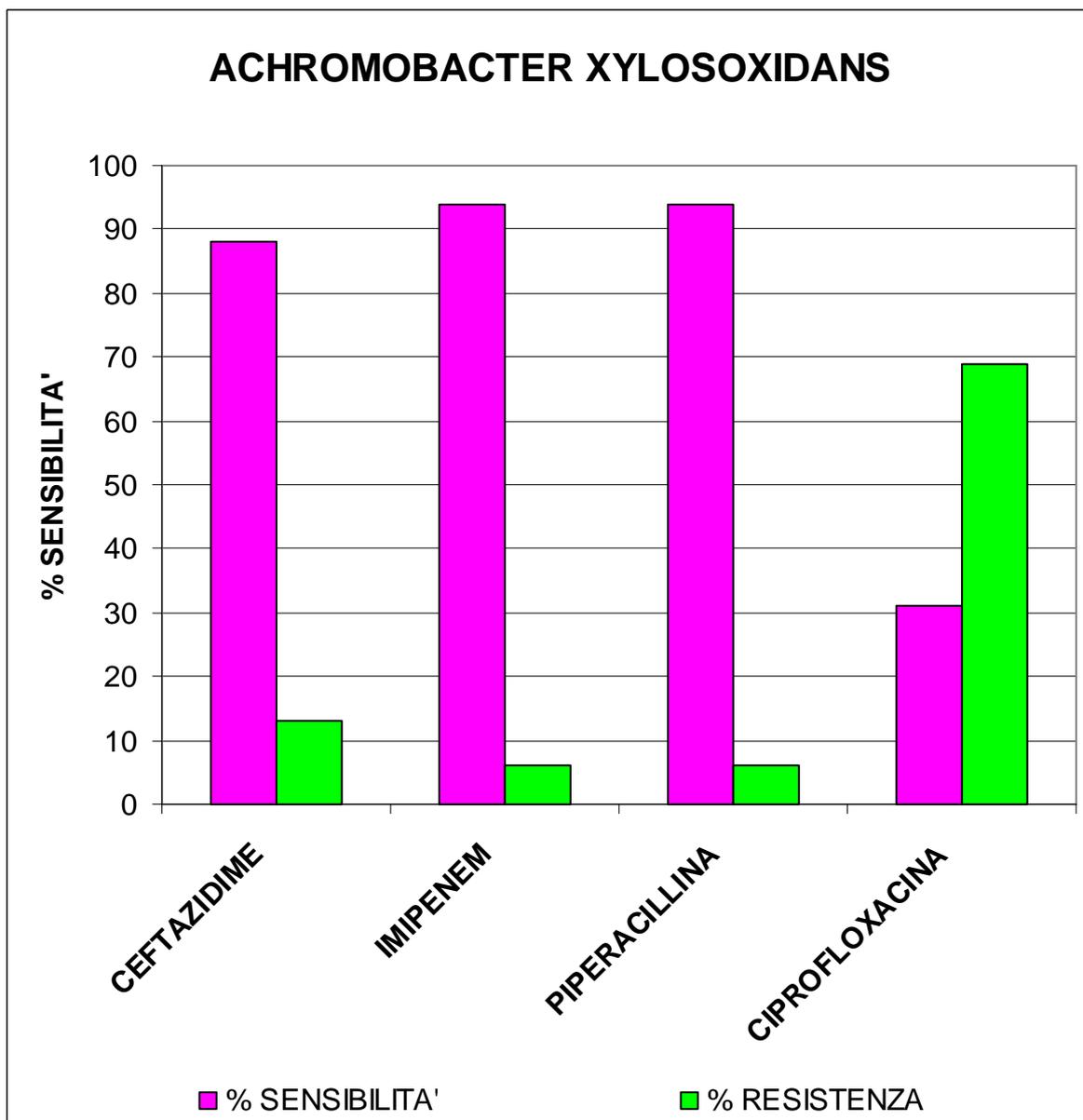


Grafico n° 6:

Percentuale di resistenza e sensibilità alle principali molecole antibiotiche impiegate nel trattamento di infezioni sostenute da *A. xylosoxidans*.

Un solo campione nel periodo studiato 01/01/2007-31-07-2010 è risultato positivo per *B. cepacia*. Per questo isolato batterico sono state analizzate le seguenti molecole antibiotiche. CIPROFLOXACINA, TOBRAMICINA, CEFTAZIDIME, IMIPENEM, PIPERACILLINA, NETILMICINA E COTRIMOSSAZOLO. Il ceppo di *B. cepacia* ha presentato sensibilità per tutte le molecole tranne che per la tobramicina, alla quale è risultato resistente.

CONCLUSIONI

Dai dati ottenuti si è può affermare che l'epidemiologia dei campioni di pazienti fibrocistici analizzati durante il periodo 01/01/2007-31/07/2010 nel laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale "Misericordia" di Grosseto rispecchia quanto riportato nella letteratura scientifica nazionale e internazionale. Le tipologie di microrganismi identificati e la loro frequenza di essi infatti possono essere paragonati ai dati internazionali pubblicati nel Registro dei pazienti CFF del 2009, nel quale si evidenzia che *P. aeruginosa* e *S. aureus* presentano una frequenza maggiore, rispettivamente 51,7% e 51,3%, rispetto a *H. influenzae* (16%), *S. maltophilia* (12,7%), *B. cepacea* (2,7%) e MRSA (23,7%).[21] Paragonando però la percentuale dei microrganismi isolati nella nostra realtà locale con i dati pubblicati dal Registro Internazionale dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica si può concludere che i dati che non riflettono pienamente l'andamento percentuale internazionale dei microrganismi isolati in pazienti fibrocistici sono quelli relativi a *S. aureus* e ai ceppi MRSA. (grafico n°7). Questa differenza può essere imputata al minore numero di campioni locali analizzati rispetto alla casistica studiata a livello internazionale.

Per quanto riguarda i dati relativi alle sensibilità antibiotiche si è osservato che la molecola antibiotica alla quale sia il morfotipo rugoso che il morfotipo mucoide di *P. aeruginosa* risultano sensibili nella totalità dei casi è la Colistina.

Inoltre è stato osservato che *P. aeruginosa* presenta un'elevata percentuale di sensibilità verso l'Imipenem e l'Aztreonam al contrario della Gentamicina e della Tobramicina verso le quali *P. aeruginosa* presenta un'elevata percentuale di resistenza.

Confrontando i risultati ottenuti per ogni categoria di farmaci per il morfotipo rugoso e per il morfotipo mucoide si può affermare che le sensibilità e le resistenze di ogni molecola sono abbastanza sovrapponibili con eccezione dei risultati ottenuti valutando la sensibilità alla tobramicina, alla quale il morfotipo mucoide presenta una maggiore resistenza rispetto al morfotipo rugoso.

Un risultato inaspettato è la notevole resistenza da parte di *P. aeruginosa* verso la Tobramicina, che rappresenta uno dei farmaci di elezione verso le infezioni che si riscontrano nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Considerando i risultati ottenuti nella valutazione della sensibilità antibiotica per *S. aureus* è stato valutato che la molecola a cui risulta sensibile nella maggior parte dei casi è la levofloxacin, mentre la tobramicina, la gentamicina e l'eritromicina sono risultate efficaci nella metà dei ceppi di *S. aureus* isolati. Un dato importante da sottolineare è che il 10% dei ceppi di *S. aureus* isolati è risultato resistente alla meticillina.

I ceppi di *H. influenzae* che sono stati isolati hanno mostrato una buona sensibilità verso le molecole antibiotiche saggiate, infatti tutti i 56 isolati di *H. influenzae* hanno mostrato sensibilità al cefotaxime e solo un ceppo ha mostrato resistenza a due molecole antibiotiche: il cloramfenicolo e la tetraciclina. Lo stesso ceppo ha presentato resistenza, insieme ad altri tre ceppi, anche alla rifampicina. Sei ceppi di *H. influenzae*, essendo β -lattamasi positivi, sono risultati resistenti all'ampicillina. Tra le molecole antibiotiche saggiate la resistenza maggiore è stata osservata con il cotrimossazolo, infatti 11 ceppi su 56 hanno mostrato resistenza alla molecola antibiotica.

Nella maggior parte dei casi i ceppi di *S. maltophilia* sono risultati sensibili alle tre principali molecole antibiotiche impiegate per il trattamento di infezione sostenute da questo batterio, soprattutto la minociclina è stata riscontrata come la molecola con un grado di sensibilità maggiore rispetto alle altre.

Osservando i risultati ottenuti valutando la sensibilità antibiotica di *A. xylosoxidans* si può notare che l'imipenem e la piperacillina risultano le due molecole antibiotiche più efficaci per il trattamento di infezioni causate da *A. xylosoxidans*. *A. xylosoxidans* è risultato, inoltre, sensibile nella maggior parte dei casi anche al ceftazidime e resistente alla ciprofloxacina.

L'isolamento di *B. cepacia* è di notevole importanza per l'inquadramento delle condizioni cliniche del paziente affetto da F.C in quanto il ritrovamento di questo germe è correlato ad un peggioramento clinico delle condizioni del soggetto. I pazienti infettati dalla *B. Cepacia* hanno infatti una maggiore tendenza ad un progressivo peggioramento della funzione polmonare rispetto ai non infettati, con conseguente impatto sulla morbilità e sulla mortalità.

Concludendo si può affermare che i dati locali relativi all'andamento delle sensibilità antibiotiche sono apparsi compatibili con quanto citato in letteratura sull'argomento. La sola discrepanza che si è osservata è stata l'elevata resistenza del ceppo rugoso di *P. aeruginosa* verso la tobramicina che secondo i dati riportati dalla letteratura viene considerato un farmaco di eccellenza nella terapia antibiotica contro le infezioni polmonari

sostenute da *P. aeruginosa* in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. È comunque importante considerare che negli ultimi anni è stato osservato un incremento della resistenza da parte di *P. aeruginosa* verso la tobramicina e per questo motivo la terapia antibiotica che viene considerata più efficace è l'associazione della tobramicina con la ciprofloxacina.

Infine è importante sottolineare che la sensibilità o la resistenza osservata in vitro può non rappresentare la reale efficacia di un antibiotico in vivo.

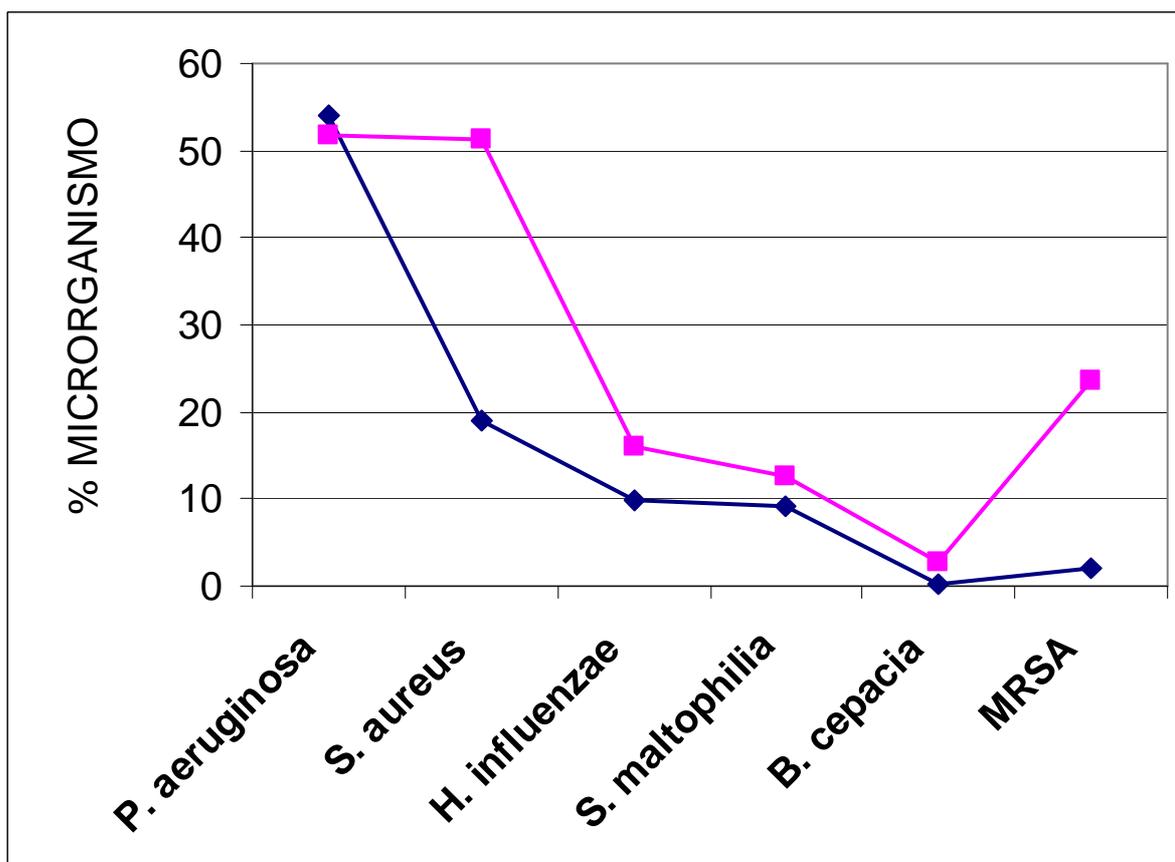


Grafico n° 7:

Paragone tra i risultati ottenuti nel periodo 01/01/2007-31/07/2010 nel laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale "Misericordia" di Grosseto (linea blu) e i risultati pubblicati nel Registro Nazionale dei pazienti CFF 2001 (linea rosa).

BIBLIOGRAFIA

1. Bianca Grosso, Barbara Messori; Clinica di Malattie dell'Apparato Respiratorio dell'Università di Torino "Dossier Fibrosi Cistica".
2. Thelethon, 2000 Filo diretto con le malattie genetiche, p. 171-176, UTET
3. Bruce R.Korf (2000) Human Genetics-: A Problem-Based Approach, 2nd p.91-137
4. Silvia Campana, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze; "Fibrosi cistica e microbiologia", Orizzonti FC, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol.3, n°2, 2 Dicembre 2007
5. F. Fontana, S.Roveta, M.Bozzolasco, E.A.Debbia, A.Marchese, Vol. VII, N° 1, 2003 p. 35-44, Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica "Considerazioni sulle problematiche microbiologiche presentate da patogeni responsabili di infezioni respiratorie in pazienti con fibrosi cistica".
6. Elmer W. Koneman, Stephen D. Allen V. R. Dowell, Herbert M. Sommers, "Color Atlas and Textbook of DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY", J.B. Lippincott Company-Philadelphia, Toronto.
7. Giuseppe Nicoletti, Vito Mar Nicolosi, "Dizionario di batteriologia umana, normale e patologica, Centro Documentazione Scientifica Menarini.

8. Graziana Manno, Laboratorio Generale di Analisi, Sezione Microbiologia della Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini e Università degli Studi di Genova “Staphylococcus aureus in Fibrosi Cistica: aspetti microbiologici e diagnostici”, Orizzonti FC, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol.3, n°2, 2 Dicembre 2007
9. “Orizzonti FC”, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol.7, n°2, Maggio-Agosto 2010, pag48-53
10. “Microbiologia Medica” AMCLI 2006; Volume 21, n° 3, Sessione 6:“MRSA: da patogeno ospedaliero a patogeno comunitario”
11. Silvia Campana,Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze, “Pseudomonas aeruginosa”, Orizzonti FC, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol. 3, n°2, 2 Dicembre 2007
12. Novella Ravenni,Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze, “Il monitoraggio immunologico dell’infezione da Pseudomonas aeruginosa”, Orizzonti FC, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol. 3, n°2, 2 Dicembre 2007
13. Paola Maccario, Rosaria Giulivo; Microbiologia e Sieroimmunologia/Laboratorio Biodiagnostica Montevergine-Calzoni “La Fibrosi cistica: impatto della diagnosi microbiologica“

14. S. Campana, G. Taccetti, N. Ravenni, F. Favari, L. Cariani, A. Sciacca, D. Savoia, A. Collura, E. Fiscarelli, G. De Intinis, M. Buseti, A. Cipolloni, A. d'Aprile, E. Provenzano, I. Collebrusco, P. Frontini, G. Stassi, M. Trancassini, D. Tovagliari, A. Lavitola, C. J. Doherty, T. Coenye, J. R. W. Govan, and P. Vandamme; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2005, p. 5136–5142, American Society for Microbiology. Vol. 43, No. 10, "Transmission of *Burkholderia cepacia* Complex: Evidence for New Epidemic Clones Infecting Cystic Fibrosis Patients in Italy"
15. Priscilla Cocchi, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze "Burkholderia cepacia complex e altri Gram- negativi difficili", Orizzonti FC, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol. 3, n°2, 2 Dicembre 2007
16. Lorenzo Calligaris, Furio Poli, Federico Marchetti Clinica Pediatrica e centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Fibrosi Cistica, Volume XXV Marzo 2006 numero 3 Protocolli diagnostici e terapia, "Ceppi emergenti in fibrosi cistica: prevalenza, impatto clinico, opzioni terapeutiche, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste.
17. Graziana Manno, Laboratorio Generale di Analisi, Sezione Microbiologia della Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini e Università degli Studi di Genova, "I patogeni fungini nell'infezione polmonare in FC: aspetti clinici e di diagnostica microbiologica", Orizzonti FC, Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica, Vol. 3, n°2, 2 Dicembre 2007

18. Giovanni Taccetti, Vanessa Boni, Ilenia Falai, Cesare Braggion, Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, “Modalità di prelievo di campioni biologici provenienti dalle vie aeree nella terapia della prima infezione o dell’infezione intermittente da *P. aeruginosa*.”, Editoriale 03/11/2004
19. Linee guida per la corretta esecuzione delle indagini microbiologiche relative a pazienti con Fibrosi Cistica.
20. Filippo Pasquinelli, Francesco Porta, volume 4, “Diagnostica e tecniche di laboratorio”, Profili diagnostici e nuove metodiche analitiche
21. Patient Registry, Annual Data Report 2009