

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE**

**Sede amministrativa: Università degli Studi di Trieste  
Dipartimento di Scienze Biomediche**

**XXI CICLO DEL  
DOTTORATO DI RICERCA IN  
FARMACOLOGIA, CHEMIOTERAPIA E MICROBIOLOGIA  
(Settore scientifico-disciplinare: MED/07)**

## **RESISTENZA AL LINEZOLID E AI GLICOPEPTIDI IN ENTEROCOCCHI ISOLATI A TRIESTE**

**DOTTORANDA:**

**Franca CIAN**

**COORDINATORE DEL COLLEGIO DOCENTE:**

**Chiar.mo Prof. Tullio GIRALDI**

Università degli Studi di Trieste

**TUTORE e RELATORE**

**Dott.ssa Lucilla DOLZANI**

Università degli Studi di Trieste

**ANNO ACCADEMICO 2007-2008**

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>- 3 -</b>
1.1. La resistenza agli antimicrobici .....	- 3 -
1.2. Nuovi farmaci .....	- 13 -
1.2.1. Farmaci introdotti di recente nell'uso clinico.....	- 13 -
1.2.2. Linezolid.....	- 17 -
1.3. Gli Enterococchi .....	- 28 -
<b>2 SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>3 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>- 37 -</b>
3.1 Isolamento e conservazione dei ceppi batterici .....	- 37 -
3.2 Identificazione e determinazione della sensibilità in vitro agli antibiotici.....	- 37 -
3.2.1 Identificazione .....	- 37 -
3.2.2 Determinazione della sensibilità agli antibiotici .....	- 38 -
3.2.3 Terreni di screening .....	- 39 -
3.3 Estrazione di DNA cromosomico.....	- 39 -
3.3.1 Estrazione fenolica .....	- 39 -
3.3.2 Estrazione rapida a 95°C .....	- 39 -
3.4 Amplificazioni geniche mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	- 39 -
3.4.1 Gene codificante rRNA 23S .....	- 40 -
3.4.2 Gene <i>vanA</i> .....	- 40 -
3.5 Analisi di restrizione.....	- 41 -
3.6 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) .....	- 41 -
<b>4 RISULTATI e DISCUSSIONE.....</b>	<b>- 43 -</b>
4.1 Raccolta e caratterizzazione dei ceppi batterici.....	- 43 -
4.2 Valutazione della presenza della mutazione.....	- 45 -
4.2.1 Estrazione di DNA con metodo rapido.....	- 45 -
4.2.2 Amplificazione del domain V e analisi in RFLP con <i>NheI</i> .....	- 48 -
4.3 Correlazione tra analisi RFLP e sensibilità al linezolid .....	- 49 -
4.4 Isolamento di <i>Enterococcus faecalis</i> VanA, resistente a linezolid, in paziente trattato con vancomicina, ma mai con linezolid .....	- 50 -
4.5 Sviluppo del Lin-screen.....	- 54 -
4.6 Verifica delle sensibilità intermedie rilevate dal Vitek .....	- 62 -
4.7 Isolamento di <i>E. faecium</i> resistente a vancomicina e linezolid in paziente trattato con linezolid ma non con vancomicina .....	- 63 -
4.8 Correlazione clonale degli <i>E. faecium</i> resistenti ai glicopeptidi. ....	- 67 -
<b>5 CONCLUSIONI .....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>- 74 -</b>

## 1. INTRODUZIONE

La scoperta di composti, naturali prima e di sintesi poi, in grado di debellare malattie un tempo definite incurabili, ha rivoluzionato la medicina moderna, creando le basi, dalla seconda metà del XX secolo, per un'intensa ricerca che ha portato sul mercato svariati farmaci ad attività antimicrobica.

L'esordio nell'uso terapeutico della penicillina, nel 1944, è stato subito seguito da segnalazioni sulla comparsa di resistenze batteriche, resistenze che hanno accompagnato poi costantemente l'introduzione di tutte le nuove molecole.

L'uso massiccio di antibiotici nelle strutture sanitarie ha incrementato l'emergenza di specie resistenti, che in tale ambiente trovano le condizioni ideali per diffondersi.

La comparsa di resistenze è spesso più veloce dello sviluppo di nuovi principi attivi, diventando così un vero problema per le organizzazioni sanitarie, sia per le implicazioni cliniche, come aumento di mortalità, durata delle malattie, sviluppo di complicanze e possibilità di epidemie, che per il notevole dispendio economico legato all'allungamento dei ricoveri e alla necessità di ricorrere a farmaci di ultima generazione molto più costosi, senza tralasciare il peggioramento della qualità di vita dei pazienti.

La conoscenza dei meccanismi di resistenza batterica e lo sviluppo di nuovi farmaci ad attività antimicrobica sono fattori essenziali per limitare i danni e mantenere aperta una possibilità di cura.

### **1.1. La resistenza agli antimicrobici**

La resistenza agli antibiotici è il risultato di svariati fattori, legati alle caratteristiche del farmaco, del microrganismo e dell'ambiente in cui vengono messi in contatto.

L'ambiente può influenzare le resistenze in modo diretto, alterando l'agente antibatterico o modificando la risposta fisiologica dei batteri verso i farmaci: pH, condizioni di anaerobiosi, concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  o di certi metaboliti e nutrienti rientrano fra i fattori ambientali capaci di modificare i principi attivi e le risposte antibatteriche (Rice 2003).

I batteri possiedono sofisticati meccanismi, genetici e biochimici, che rendono possibile la loro sopravvivenza in ambienti ostili e il loro adattamento alle continue variazioni dell'ecosistema in cui sono inseriti.

Si possono distinguere in ambito batterico vari tipi di resistenza: la **resistenza naturale** o intrinseca, legata a caratteristiche genetiche, strutturali o fisiologiche di un microrganismo, è associata a tutti i ceppi appartenenti ad un particolare gruppo, specie o genere batterico;

conoscendo quindi l'identità del microrganismo si può facilmente prevedere questo tipo di resistenza; la **resistenza acquisita** deriva da modificazioni dell'assetto genetico normale, con conseguenti modifiche fisiologiche e di struttura; può essere presente solo in alcuni ceppi di un gruppo o specie batterica e quindi è imprevedibile; l'acquisizione di tale tipo di resistenza è legata a modificazioni genetiche per mutazioni e/o per acquisizione di nuovi geni attraverso lo scambio di materiale genetico fra microrganismi (Rice 2003).

Si distingue inoltre la **resistenza endogena**, determinata da mutazioni in geni cromosomici strutturali o regolatori: non è infettiva in quanto è ereditata verticalmente solo dalla progenie attraverso la duplicazione cromosomica, è rara, perchè solitamente l'evento mutazionale avviene con frequenza piuttosto bassa (tra  $10^{-7}$  e  $10^{-10}$ ), ma in popolazioni molto grandi e a crescita esponenziale ed è tipica di batteri intracellulari obbligati, che non possono scambiare DNA in condizioni naturali; la **resistenza esogena** invece è legata ad elementi genetici accessori, mobili, come plasmidi e trasposoni, che possono trasferire i determinanti di resistenza, spesso a più antibiotici, tra i batteri, anche appartenenti a generi e specie diverse (Courvalin 2008).

È impossibile prevenire l'emergenza di resistenze, evento raro, casuale e di solito transitorio, se non determina un vantaggio selettivo; è necessario considerare che la resistenza esiste in natura da epoche antecedenti l'introduzione degli antibiotici; molti di questi infatti sono di derivazione naturale e i loro produttori hanno dovuto sviluppare meccanismi di protezione per evitare il danno provocato da sostanze da loro stessi prodotte; da qui poi i determinanti di resistenza si sono diffusi, con l'aiuto dato dall'estensione dell'uso di antibiotici e dalla pressione selettiva da essi determinata.

### **1.1.1. meccanismi di resistenza**

I meccanismi di resistenza sviluppati dai batteri sono essenzialmente quattro: modificazione specifica del target (ad esempio mutagenesi dei residui chiave o metilazione post-trascrizionale del substrato), che porta alla perdita o alla diminuzione di affinità del farmaco per il suo bersaglio; inattivazione enzimatica dell'antibiotico con modifica della sua parte molecolare attiva; diminuita permeabilità con la diminuzione del numero o del diametro delle porine nella membrana esterna dei Gram-negativi, quindi impossibilità di entrata o minor assorbimento del farmaco; espulsione dell'antibiotico dalla cellula, tramite pompe di efflusso energia-dipendenti. Non di rado lo stesso batterio può avere più di un meccanismo di resistenza.

Il risultato finale è sempre quello di impedire l'interazione del farmaco con il bersaglio ed i meccanismi per raggiungerlo sono comuni, sia che si tratti di resistenza intrinseca, sia in caso di resistenza acquisita (Courvalin 2008).

In alcuni casi il meccanismo di resistenza viene espresso sempre, ma di solito le resistenze favoriscono i batteri solo in occasioni transitorie, quando è presente l'agente contro cui sono state prodotte, ed è naturale che i microrganismi possano modulare l'espressione dei geni di resistenza che verranno così espressi solo in caso di necessità, con il conseguente risparmio energetico, rendendone però difficile la rilevazione con i comuni test di sensibilità.

### **1.1.2. fattori che favoriscono la comparsa di resistenze**

La velocità e l'estensione dello sviluppo delle resistenze dipendono da svariati fattori, su molti di essi è possibile intervenire; fra questi sono compresi: il miglioramento delle pratiche mediche, la razionalizzazione delle prescrizioni, influenzare le aspettative e la percezione dei consumatori, ridurre l'uso degli antibiotici in allevamento e agricoltura (Heymann 2006); uno dei fattori principali, per creare le condizioni ideali allo sviluppo delle resistenze, è sicuramente la quantità cumulativa di antibiotici usati (Andersson 2004) e il loro utilizzo senza necessità, si pensi ad esempio alla loro prescrizione in caso di malattie dell'apparato respiratorio, spesso di origine virale (Ament 2002).

Altri fattori sono legati alle caratteristiche del farmaco, come lo spettro antibatterico e la farmacocinetica, fattori che hanno un grande impatto sulla flora commensale; o dipendono dal dosaggio, dove la compliance del paziente e l'uso della dose ottimale sono essenziali per evitare concentrazioni inferiori al limite di sensibilità batterica o picchi variabili nel sito infettivo, che possono selezionare mutanti resistenti; a questo proposito si fa strada una strategia per l'eliminazione dei resistenti, basata sull'impiego di dosi maggiori di farmaco, in modo che nel sito infetto si raggiungano concentrazioni superiori a quelle che prevenivano la selezione dei mutanti: il concetto di MIC lascia il posto a quello di MPC o mutant prevention concentration (Drlica 2007).

Anche il tipo di somministrazione può essere implicato: antibiotici a somministrazione orale (aminopenicilline, macrolidi, fluorochinoloni etc.) sono preferiti in terapie ambulatoriali o a domicilio, creando le condizioni per lo sviluppo di resistenze anche in ambienti extraospedalieri.

La flora commensale intestinale è un'associazione complessa di cellule che svolgono funzioni importanti per l'organismo ospite, fra le quali sono incluse: la partecipazione al completamento del processo di digestione dei cibi, con la liberazione di molecole semplici di carboidrati, aminoacidi e vitamine; la stimolazione della vascolarizzazione e dello sviluppo

dei villi intestinali; un importante contributo riguarda la difesa dell'ospite, limitando la colonizzazione e il sopravvento delle specie patogene o dei patogeni opportunisti e cooperando al mantenimento del sistema immune gastrointestinale; i microrganismi compresi nella flora intestinale sono numerosissimi, si calcola che nel colon siano presenti  $10^{12}$  batteri per g di contenuto, con gli anaerobi in grande maggioranza, si supera il rapporto di 1000 a 1; inoltre sono rappresentate più di 500 specie diverse con una composizione variabile secondo lo stato di salute, l'età e la dieta (Gilmore 2003, Andersson 2004).

La pressione selettiva, determinata da **terapie con antibiotici**, in particolare quelli che vengono eliminati inalterati per via fecale, provoca effetti dirompenti sulla flora intestinale, con la scomparsa dei batteri sensibili della microflora indigena e la moltiplicazione degli eventuali batteri resistenti, presenti nella microflora, ma tenuti a bada normalmente dalla microflora sensibile, o favorendo la crescita di patogeni resistenti ingeriti; l'alterazione del delicato equilibrio ha importanti implicazioni sulle procedure di controllo delle infezioni, visto che le specie resistenti, una volta insediatesi, possono persistere anche dopo la cessazione della terapia e la ricostituzione della microflora (Donskey 2004).

L'alterazione dell'equilibrio della microflora intestinale può portare, inoltre, alla contemporanea presenza, nello stesso sito, di patogeni diversi, magari con particolari resistenze ad antibiotici, creando le condizioni per il trasferimento di geni di resistenza tra le specie, soprattutto in ambiente ospedaliero, dove la trasmissione di microrganismi è facilitata dalle interazioni con oggetti o superfici contaminate e con operatori sanitari portatori a cui si aggiungono le condizioni di debilitazione e immunosoppressione dei pazienti.

Fattori che non si possono controllare sono dovuti alle caratteristiche intrinseche ai batteri quali mutazioni e capacità di trasmissione di materiale genetico, che determinano la velocità di comparsa dei ceppi resistenti; o il costo relativo alla diminuzione della fitness e la variabilità del comportamento microbico all'esposizione ai farmaci, che dipende dalla specie batterica e dal principio attivo (Andersson 2004).

### **1.1.3. fitness**

L'acquisizione di resistenza è di solito associata ad un costo biologico per il microrganismo, che generalmente provoca una riduzione di fitness, intesa come capacità di crescita, moltiplicazione e/o virulenza, dei batteri (Spratt 1996). Il costo delle resistenze può essere determinato dall'acquisizione di geni per nuove funzioni, o dall'interferenza con importanti meccanismi legati al metabolismo batterico, o ancora dalla richiesta di energia supplementare necessaria per la replica e il mantenimento dei determinanti di resistenza mobili. In presenza della pressione selettiva da parte degli antibiotici i ceppi resistenti saranno avvantaggiati:

sfavoriti per costo, saranno però favoriti dall'insensibilità all'antibiotico che eliminerà invece i ceppi sensibili. L'entità del costo biologico è importante per la stabilità e l'eventuale reversibilità della resistenza (Courvalin 2008); il cessare della terapia antibiotica porta generalmente alla diminuzione della farmacoresistenza, ma essa non scompare completamente, esistono sempre microrganismi resistenti in assenza di una pressione selettiva diretta e questo potrebbe avere due spiegazioni: se la resistenza è determinata da varie mutazioni con costi diversi, in vivo saranno selezionate quelle con costo minore, cioè quelle che in assenza di antibiotico determineranno una fitness paragonabile ai ceppi originari (Sander 2002); oppure l'acquisizione di mutazioni compensatorie. Ci sono prove, sia in vitro che in vivo, che i batteri sono capaci di adattarsi alla diminuita fitness, con mutazioni compensatorie, che li riportano alla fitness originaria senza alterare la resistenza (Gillespie 2001, Kugelberg 2005); in questo caso i ceppi resistenti non avranno alcuno svantaggio in assenza di antibiotico e non scompariranno con il cessare della terapia. Tale meccanismo compensatorio è molto più frequente della reversione al fenotipo sensibile.

In entrambi i casi i ceppi resistenti sopravvivranno anche in assenza dell'agente che ha indotto la resistenza e saranno eliminabili con molta difficoltà.

In qualche caso le alterazioni metaboliche determinate dall'antibiotico resistenza possono mantenere inalterata la fitness o addirittura portare a vantaggi in determinati ambienti (Martinez 2009).

#### **1.1.4. resistenza ed epidemiologia nei batteri Gram positivi**

L'emergenza di patogeni Gram-positivi, spesso resistenti per l'uso e le somministrazioni prolungate di antibiotici a largo spettro, crea notevoli problemi in ambiente ospedaliero, per la gravità delle malattie loro associate e per l'imprevedibilità delle loro resistenze; problemi che si estendono all'ambito comunitario, dove si assiste sempre più spesso alla comparsa di pattern di resistenza simili a quelli osservati in ospedale, determinando il fallimento delle terapie empiriche normalmente usate (Manfredi 2006) e creando le condizioni per un continuo interscambio di ceppi resistenti, quando sono interessate le strutture di lungodegenza, come case di riposo o residenze assistite, dove i trasferimenti all'ospedale sono frequenti.

L'aumento considerevole di infezioni acquisite in ambiente ospedaliero, o **infezioni nosocomiali**, è preoccupante, per i costi elevati che determina in sanità pubblica; il fenomeno è considerato una vera priorità in molti paesi, che hanno sviluppato di conseguenza strategie politiche e investito mezzi finanziari cospicui per una loro diminuzione (Spratt 2005); le infezioni nosocomiali sono infezioni che insorgono durante il ricovero (>48 ore dopo l'ingresso in ospedale) e in alcuni casi dopo la dimissione, e che non erano manifeste

clinicamente o in incubazione al momento del ricovero. Circa il 5% di pazienti ricoverati in reparti per malati acuti contrae almeno un'infezione nosocomiale, spesso causata da patogeni opportunisti multiresistenti.

Studi multicentrici su infezioni sistemiche hanno rilevato che più della metà di queste sono imputabili ai Gram-positivi e che i responsabili sono principalmente stafilococchi coagulasi-negativi, *S. aureus* ed enterococchi.

In tutto il mondo si assiste al continuo aumento delle resistenze, fra cui la meticillino-resistenza, che fra gli stafilococchi può arrivare a picchi del 60-80% ed essere elevatissima nei reparti di terapia intensiva o nelle unità di trapianto; ancora più elevata è la percentuale di meticillino-resistenza fra gli stafilococchi coagulasi-negativi, un tempo considerati solo come componenti innocui della flora commensale cutanea (Manfredi 2006) e la resistenza ai glicopeptidi, che negli Stati Uniti ha raggiunto in passato punte elevatissime: in *E. faecium* è arrivata al 76,3% nel periodo 2000-2002 in reparti di terapia intensiva (Jones 2004).

In Europa le statistiche mostrano un trend leggermente migliore, ma comunque preoccupante; di seguito sono riportati i dati sulle resistenze nei germi Gram-positivi causa di infezioni rilevanti, ricavati dal rapporto 2006 dell'EARSS, che riepiloga i dati europei nel periodo 1999-2005 (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2006), dai rapporti ISTISAN, dell'Istituto Superiore di Sanità italiano, relativi al periodo 2003-2005 (Alfonsi 2007) e dal registro delle resistenze agli antibiotici per la regione Friuli Venezia Giulia, che ha elaborato i dati relativi al periodo 2004-2006 (Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Agenzia Regionale della Sanità 2007).

***Staphylococcus aureus***: è per lo più un innocuo colonizzante della cute, si trova nel 30% degli individui sani, ma può causare infezioni gravi ed è inoltre in grado di sviluppare facilmente resistenze verso svariati farmaci, quali  $\beta$ -lattamici, aminoglicosidi, macrolidi, streptogramine, lincosamidi, fluorochinoloni (Schito 2006).

L'antibiotico-resistenza più diffusa è la resistenza alla oxacillina-meticillina (penicilline semisintetiche resistenti alla penicillinasi) e i ceppi portatori di tale resistenza (MRSA) sono dilaganti in tutto il mondo e sviluppano facilmente resistenze verso altri farmaci rendendo difficile il loro trattamento.

Di recente è emersa anche una ridotta sensibilità (VISA con MIC di 8-16  $\mu\text{g/ml}$ ) o resistenza propria (VRSA con MIC  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ) ai glicopeptidi, usati spesso per il trattamento delle infezioni da MRSA; resistenza dovuta nei VRSA all'acquisizione del gene *vanA* dagli enterococchi e nei VISA forse all'ispessimento della cell-wall. I ceppi VISA ed hVISA (popolazioni di *S. aureus* in cui sono presenti sottopopolazioni con gradi diversi di sensibilità



alla vancomicina) sono spesso difficilmente rilevabili con i test di sensibilità, ma sono fortemente sospettati di essere causa di molti insuccessi terapeutici nei trattamenti con vancomicina (Wootton 2007, Levine 2006).

In Europa viene rilevata una bassissima frequenza negli Stati settentrionali, 0-3%, di MRSA invasivi, mentre negli Stati dell'Europa centrale la frequenza aumenta fino al 25% e si assiste alla comparsa di frequenze elevate, fino al 40%, negli Stati meridionali; fortunatamente si sta verificando in molti paesi un decremento negli ultimi anni. La frequenza aumenta notevolmente se vengono considerati MRSA isolati dai reparti di terapia intensiva, arrivando anche al 60%, 55,3% in Italia.

In Italia la percentuale di MRSA è tuttora elevata, ma si assiste ad un leggero decremento: dal 44% del 2000 al 37% del 2005 e non sono ancora emersi ceppi resistenti ai glicopeptidi. Ci sono differenze significative fra il Sud, che presenta meno resistenze, e il Centro con il 40% di MRSA.

Gli MRSA sono di frequente resistenti ad altri antibiotici: dai dati ISTISAN risulta che il 54,7% è resistente ad almeno 4 classi di antibiotici oltre alla meticillina, il 32,4% ad almeno 5, e il 2,3% ad almeno 7.

I dati in Friuli Venezia Giulia risultano in linea con quelli europei, attestandosi intorno al 30% nel triennio 2004-2006.

***Streptococcus pneumoniae***: è un ospite delle prime vie respiratorie, ma può diventare responsabile di processi infettivi quali polmoniti, sepsi e meningiti, è la causa più frequente di polmoniti in comunità (CAP) e di infezioni respiratorie nei primi anni di vita. È ampiamente diffusa la resistenza ai  $\beta$ -lattamici e la maggior prescrizione di farmaci alternativi ha creato le condizioni per l'aumento della resistenza verso macrolidi e nuovi fluorochinoloni. I dati sulle resistenze europee in ceppi invasivi riportano una grande variabilità per la resistenza alla penicillina, che nel 2005 va dall'1% dell'Olanda al 39% della Romania; mentre i dati relativi alla resistenza all'eritromicina variano dal 10 al 25%; in genere la resistenza verso entrambi i composti resta inferiore al 5%.

In Italia viene registrata una presenza di ceppi resistenti relativamente costante negli anni, che si attesta al 5% nel 2005 per la penicillina, arrivando al 9-10% se vengono considerati anche i ceppi a sensibilità intermedia, e al 31% per i macrolidi. La resistenza verso entrambi, considerando anche la sensibilità intermedia, è leggermente superiore al resto d'Europa, con il 7,4%; non è stato segnalato alcun ceppo intermedio o resistente alla vancomicina.

In Friuli Venezia Giulia sono state rilevate percentuali di resistenza che variano dal 22 al 28% per i macrolidi e si attestano al 5% per la penicillina.

Si è visto che la maggior parte dei sierogruppi che manifestano resistenza sono compresi nel vaccino glicoconiugato 7-valente attualmente disponibile e quindi la vaccinazione di massa potrebbe essere un buon sistema per portare alla diminuzione della resistenza.

***Enterococcus faecalis/faecium***: negli ultimi decenni essi sono emersi come importanti patogeni nosocomiali e parallelamente si sono moltiplicate le resistenze ai glicopeptidi e agli aminoglicosidi ad alto livello, rendendo ancora più difficile il loro trattamento (vedi il capitolo Enterococchi).

I dati europei, riguardanti la resistenza agli aminoglicosidi ad alto livello, per *E. faecalis*, nel 2005, rilevano una grande variabilità, andando dallo 0% dell'Islanda al 54% della Grecia, con la maggior parte degli Stati che registra resistenze fra il 25% e il 50%, senza un grosso cambiamento rispetto agli anni precedenti; non sono registrati casi di completa resistenza alla penicillina.

Per l'Italia nel 2005 viene registrato il 4% di ceppi resistenti o a sensibilità intermedia alla penicillina, 38% per la resistenza agli aminoglicosidi ad alto livello e 3% per la resistenza ai glicopeptidi, con minime variazioni fra gli anni.

In Friuli Venezia Giulia i dati si avvicinano a quelli medi italiani, con un 3,2% di resistenza alla penicillina, ma sono nettamente inferiori per la resistenza ai glicopeptidi che registra solo lo 0,6%.

La resistenza alla vancomicina in *E. faecium* in Europa è di difficile interpretazione, perchè solitamente dovuta ad epidemie localizzate in singoli ospedali, che non rappresentano la situazione globale; si riportano così frequenze che vanno da 0 al 37% della Grecia e al 46% di Israele nel 2005, in forte aumento rispetto agli anni precedenti.

In Italia viene registrato un 19% di resistenza ai glicopeptidi, con dati variabili negli anni precedenti dal 15 al 24%.

In Friuli Venezia Giulia anche per *E. faecium* la resistenza ai glicopeptidi è minima, attestandosi al 3,4%.

La multiresistenza è diffusa in Italia: il 50,1% di *E. faecium* vancomicina-resistente risulta inoltre resistente ad almeno altri 4 antibiotici, mentre il 21,3% di *E. faecalis* resistente alla vancomicina è resistente ad almeno altri 4.

**Stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS)**: il ruolo di questi batteri nell'eziologia delle infezioni non è sempre chiaro, data la loro presenza come colonizzanti in molti siti; essi però sono ora riconosciuti come importanti patogeni nosocomiali, capaci di produrre stati infettivi soprattutto in pazienti portatori di protesi, cateteri o in stato di immunodepressione.

I dati epidemiologici, relativi alle resistenze dei CoNS, in uno studio statunitense su isolati provenienti da vari ospedali (Draghi 2005) e in uno che considera i soli reparti di terapia intensiva di vari Stati europei e del Nord-America nel periodo 2000-2002 (Jones 2004), riportano una resistenza all'oxacillina generalmente superiore al 70%, 80% nelle terapie intensive; non sono riportate resistenze alla vancomicina, ma sono state evidenziate resistenze elevate contro fluorochinoloni, intorno al 50% o superiori per le terapie intensive e a cefalosporine, più contenute per aminoglicosidi. Anche in questo caso c'è una variabilità fra i paesi partecipanti. Come per *S. aureus*, la resistenza all'oxacillina è spesso accompagnata da resistenze verso aminoglicosidi, fluorochinoloni, macrolidi e altri con frequenze variabili in dipendenza dell'uso di questi farmaci nelle singole realtà.

In Friuli Venezia Giulia sono frequenti ceppi a resistenza multipla ( $\beta$ -lattamici, chinoloni, aminoglicosidi, tetracicline e altri), mentre i CoNS resistenti alla vancomicina sono ancora assenti, ma compare una piccola percentuale di ceppi a resistenza intermedia, 0,36%, e si segnala la comparsa di alcuni isolati resistenti alla teicoplanina, 0,6%.

**Streptococchi  $\beta$  emolitici:** i dati sulle resistenze riguardano gli streptococchi di gruppo A (*S. pyogenes*), B (*S. agalactiae*) C e G secondo la classificazione di Lancefield: sono tutti ampiamente sensibili ai  $\beta$ -lattamici, mentre viene presa in esame la resistenza a macrolidi e lincosamidi, alternative terapeutiche per infezioni invasive, in associazione ai primi, o in caso di allergie.

In Europa le resistenze variano molto, anche in questo caso, da paese a paese, si va infatti da < 5% della Norvegia a quasi il 30% della Spagna.

In Italia le resistenze ai macrolidi sono in diminuzione (dal 46% del 1996 al 18% del 2005).

In Friuli Venezia Giulia i dati sono allineati alla media italiana con l'11-14% di resistenza ai macrolidi e leggermente inferiore per le lincosamidi.

**Resistenza a più farmaci (Multi-Drug Resistance o MDR):** come si è visto in precedenza, la resistenza ad un principio attivo si accompagna spesso a resistenza verso uno o più altri farmaci, creando il presupposto per la comparsa di specie multiresistenti (MDR): non c'è accordo per definire gli organismi MDR, alcuni includono fra questi anche la resistenza ad una sola classe, come MRSA o VRE, altri invece considerano la resistenza a più classi; di solito i microrganismi MDR sono resistenti a tutti, salvo uno o due, gli antimicrobici disponibili in commercio; c'è invece completo accordo sulla gravità dei problemi causati dagli MDR, non ultima la difficoltà di terapie appropriate, e sulla necessità di misure di controllo condivise (Siegel 2006).

**Variabilità epidemiologica e linee guida:** i dati epidemiologici, sopra segnalati, indicano una grande variabilità geografica delle antibiotico-resistenze, sia a livello di nazioni, che di singole realtà locali, ma si possono rilevare differenze circoscritte a piccole zone ben delimitate, come singoli ospedali, se non a livello di reparti ospedalieri e questo rende praticamente impossibile estrapolare linee guida a validità universale, mentre è necessario creare programmi di sorveglianza adattati alla realtà locale delle specie batteriche e delle loro resistenze.

Negli ultimi anni si sono attivati gruppi di lavoro e progetti nazionali ed internazionali. Alcuni esempi sono già stati citati in precedenza: AR-ISS, sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza, che dal 2001 elabora i dati di sensibilità agli antibiotici di 5 specie di batteri invasivi, provenienti da 48 laboratori sentinella italiani, a cura dell'Istituto Superiore di Sanità; EARSS, cioè l'European Antimicrobial Resistance Surveillance System, che dal 1999 mantiene un sistema di sorveglianza europeo, comparando i dati sulla prevalenza e diffusione dei batteri invasivi più rilevanti raccolti da 1400 ospedali sparsi in 32 nazioni; NNIS, National Nosocomial Infection Surveillance system, che con Project ICARE, Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology, che coinvolge le terapie intensive di 40 ospedali statunitensi, raccoglie dati negli Stati Uniti.

A questi si aggiungono tutti i progetti finalizzati ai farmaci di recente introduzione, per la raccolta dati sull'emergenza di resistenze e su eventuali effetti collaterali nel lungo periodo.

È a livello locale però che la sorveglianza deve essere particolarmente mirata, i dati raccolti con progetti di sorveglianza locale sono fondamentali, per selezionare le opportune linee guida per il trattamento di infezioni specifiche nei singoli reparti e per determinati pazienti.

Nella regione Friuli Venezia Giulia è già attivo dal 1996 un programma di sorveglianza delle infezioni ospedaliere, partito con l'istituzione di una rete di monitoraggio dell'incidenza di infezioni nel sito chirurgico; il programma poi è stato ampliato creando una rete di laboratori sentinella, che rappresentano l'intera sanità regionale, e utilizzando una piattaforma informatica per elaborare i dati, trasmessi dai singoli laboratori, sui patogeni di interesse clinico ed epidemiologico (Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Agenzia Regionale della Sanità. 2007).

Negli Ospedali triestini è inoltre operativo il Comitato delle Infezioni Ospedaliere (CIO), che ha attivato un programma di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza di alcuni microrganismi significativi e che, in base all'elaborazione dei dati provenienti dal Laboratorio di Microbiologia, predispone linee guida di profilassi e di terapia antibiotica per un controllo efficace delle infezioni legate all'assistenza sanitaria.

L'introduzione, negli ambienti ad alto rischio quali reparti ospedalieri critici, ma anche strutture comunitarie di lungodegenza o case di riposo, di appropriate misure di prevenzione e linee guida per un corretto uso degli antibiotici, si è dimostrato un metodo efficace per ridurre la comparsa e la diffusione delle resistenze, ma è necessaria una verifica attenta e costante per invertire la tendenza all'aumento delle specie che sviluppano meccanismi di resistenza.

## **1.2. Nuovi farmaci**

La crescente comparsa di specie batteriche resistenti ai farmaci, sia in ambiente nosocomiale, che a livello comunitario, e la preoccupante ascesa di Gram-positivi resistenti alla vancomicina, farmaco chiave e ultima risorsa per il trattamento di infezioni causate da specie multiresistenti, sono gravi minacce che possono essere arginate con lo sviluppo di nuovi antimicrobici.

L'industria farmaceutica cerca di sopperire alla costante richiesta di farmaci, ma lo studio di nuove molecole attive richiede molti anni e spesso la loro introduzione nell'uso clinico è in breve neutralizzata dai meccanismi di variabilità batterica. Le grosse compagnie farmaceutiche inoltre sono indirizzate preferibilmente verso ricerche in campi più redditizi, quali i trattamenti delle malattie croniche dovute all'invecchiamento della popolazione, tralasciando gli agenti antimicrobici.

### **1.2.1. Farmaci introdotti di recente nell'uso clinico**

Di seguito sono elencati alcuni fra i farmaci introdotti nell'uso clinico dopo il 2000 e particolarmente attivi verso batteri Gram-positivi (Tab 1.1).

**Ertapenem** (Invanz): è un nuovo carbapenemico stabile alla deidropeptidasi renale; agisce, come tutti i  $\beta$ -lattamici, sulla parete batterica inibendone la sintesi tramite il legame alle PBPs, con un'affinità di legame maggiore di altri  $\beta$ -lattamici, ma sovrapponibile a quella degli altri carbapenemici; è particolarmente resistente alle  $\beta$ -lattamasi, anche a quelle a spettro esteso o ESBL.

È attivo in vitro contro *S. pneumoniae*, sensibile alla penicillina, *S. pyogenes* e streptococchi viridanti, *S. aureus* sempre meticillina-sensibile e stafilococchi coagulasi-negativi; è efficace contro enterobatteri, *H. influenzae*, *Branhamella/Moraxella catarrhalis*, alcuni anaerobi, fra cui *C. perfringens* e *Peptostreptococcus*; non è attivo contro *S. pneumoniae* resistente alla penicillina (PRP), MRSA ed enterococchi.

Non sembra offrire un'alternativa efficace verso infezioni sostenute da Gram-positivi multiresistenti, o per le gravi infezioni nosocomiali dovute a Gram-negativi, mentre può

essere una valida scelta per infezioni causate da enterobatteri, o in pazienti con infezioni batteriche miste da germi aerobi e anaerobi, soprattutto per il vantaggio determinato dall'unica somministrazione giornaliera (Furno 2002b).

**Daptomicina:** è un lipopeptide ciclico, ha azione battericida molto veloce; agisce inserendosi nella membrana citoplasmatica batterica in modo calcio-dipendente; la sua inserzione negli strati profondi della membrana in qualche modo modifica i movimenti ionici attraverso la membrana causando la sua depolarizzazione e probabilmente anche alterando l'integrità della membrana stessa, senza però portare a lisi batterica e ai conseguenti esiti settici e infiammatori (Hancock 2005). Ha azione battericida molto rapida e si è dimostrata attiva in tutte le fasi del ciclo batterico, non solo nella fase di crescita, come la maggior parte degli antimicrobici, quindi può essere utile in infezioni gravi come endocarditi e osteomieliti. È efficace contro tutti i Gram-positivi importanti in clinica come *S. aureus*, anche MRSA, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* e *E. faecalis* vancomicina-sensibile; il suo particolare meccanismo di azione sembrerebbe evitare l'insorgere di resistenze anche se casi sporadici si sono verificati soprattutto quando non sono stati seguiti correttamente i protocolli terapeutici.

**Moxifloxacin** (Avalox): è un fluorochinolone 8-metossi derivato, con uno spettro d'azione particolarmente allargato, soprattutto verso batteri Gram-positivi, anaerobi e atipici (Furno 2002b).

Il meccanismo d'azione è quello tipico dei fluorochinoloni, cioè l'inibizione degli enzimi DNA-girasi e topoisomerasi IV, che provoca alterazione nella duplicazione, trascrizione e riparazione del genoma batterico, con il conseguente blocco della replica e dell'espressione genica. La moxifloxacin, a differenza dei fluorochinoloni meno recenti, ha affinità intrinseca elevata per entrambi gli enzimi bersaglio (dual-targeting quinolone).

È indicata nel trattamento delle infezioni alle alte e basse vie respiratorie e in infezioni cutanee non complicate; in vitro è molto più attiva della levofloxacin verso *S. pneumoniae*, anche resistente a penicillina e macrolidi e su *S. pyogenes*, anche resistente ai macrolidi; è efficace contro *S. aureus* ed enterococchi, ma generalmente MRSA e VRE risultano resistenti. È attiva contro patogeni atipici a localizzazione intracellulare (*Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*) e contro *Haemophilus influenzae* e *Branhamella/Moraxella catarrhalis*, con efficacia sovrapponibile ad altri fluorochinoloni.

Presenta una ridotta tendenza a selezionare in vitro ceppi resistenti, per la sua caratteristica di dual-targeting, ma mancano ancora sufficienti dati clinici.

**Gatifloxacina:** come il precedente, è un fluorochinolone 8-metossi derivato e rientra nei dual-target quinolones. Ha uno spettro di attività sovrapponibile alla moxifloxacina e risulta attiva in vitro anche contro molti anaerobi; ha scarsa attività contro enterococchi, MRSA, stafilococchi coagulasi-negativi, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*.

Rispetto ai fluorochinoloni tradizionali non sembra rappresentare un avanzamento terapeutico particolare, pur restando un farmaco valido per il trattamento di varie infezioni, comunque non da usare come terapia empirica soprattutto in comunità (Furno 2002b).

**Quinopristin/dalfopristin (Synercid):** è una streptogramina derivato dalla pristinamicina, farmaco ampiamente usato nell'allevamento come promotore della crescita; è composto da due peptidi ciclici A (dalfopristin) e B (quinopristin), strutturalmente differenti, che sono batteriostatici se separati, ma in combinazioni adeguate sono battericidi. I due componenti penetrano nei batteri per diffusione e agiscono sinergicamente sulla subunità ribosomica 50S, legandosi in due regioni distinte, ma sovrapposte, a livello del sito peptidilico, inibendo irreversibilmente la sintesi proteica; il legame di A al ribosoma provoca una modifica conformazionale che aumenta l'affinità di legame di B. Il Synercid ha azione battericida verso la maggior parte dei patogeni respiratori, fra cui pneumococco, anche PRP, *Mycoplasma* spp., *Legionella* spp. e *Chlamydia pneumoniae*; è attivo contro il 90% degli *S. aureus* e stafilococchi coagulasi-negativi, inclusi i ceppi meticillina-resistenti, se non dotati di resistenza costitutiva contro macrolidi, lincosamidi e streptogramine B (MLS<sub>B</sub>), e ceppi resistenti o a sensibilità intermedia alla vancomicina, mentre svolge un'azione batteriostatica nei confronti di *Enterococcus faecium* anche vancomicina-resistente e non è attivo contro *E. faecalis*, per resistenza intrinseca dovuta alla presenza di una pompa di efflusso (Hancock 2005). È la prima streptogramina per uso sistemico parenterale, ma il suo uso clinico è ridotto sia per il costo elevato sia per gli effetti collaterali (mialgie, artralgie, tromboflebiti).

La selezione di ceppi resistenti dovrebbe essere molto ridotta, per il fatto che il suo modo di azione coinvolge il sinergismo tra due molecole strutturalmente diverse; sono stati segnalati casi di resistenza verso l'uno o l'altro dei composti: la resistenza verso quinopristin è mediata da plasmidi, la resistenza verso dalfopristin è legata a pompe di efflusso o più comunemente a causa di acetiltransferasi, prodotte in risposta alla virginiamicina, altra streptogramina usata in passato in agricoltura e nell'allevamento.

**Telitromicina (Ketek):** è il primo chetolide appartenente alla famiglia dei macrolidi-lincosamidi-streptogramine B, derivato semisintetico dell'eritromicina. Si lega alla subunità ribosomiale 50S interagendo con il domain V nell'rRNA 23S ma anche con il domain II, a cui i macrolidi si legano debolmente, bloccando il tunnel di uscita e quindi la sintesi proteica. I

chetolidi hanno maggiore affinità dell'eritromicina per lo stesso sito legante e sono efficaci anche in caso di eritromicina-resistenza. Sono attivi verso molti Gram-positivi, fra cui anche *Streptococcus pneumoniae* resistente ai macrolidi, e contro Gram-negativi causa di infezioni respiratorie, ma non sono efficaci contro MRSA ed enterococchi resistenti all'eritromicina. L'efficacia del farmaco è comunque per lo più sovrapponibile a quella dei macrolidi; solo nelle infezioni respiratorie causate da *S. pneumoniae* resistente a penicillina ed eritromicina la sua efficacia risulta superiore (Furno 2002a). I chetolidi non inducono resistenza MLS<sub>B</sub>, ma iniziano a comparire batteri con mutazioni puntiformi nel rRNA 23S. La loro tossicità era praticamente nulla, ma recentemente sono stati segnalati casi di epatite in seguito all'impiego del farmaco, per cui è stata sconsigliata la terapia con telitromicina per infezioni quali bronchite, tonsillite o sinusite per le quali il profilo rischio/beneficio del farmaco non sarebbe favorevole (Informazioni sui farmaci 2007a).

**Tigeciclina** (Tygacil): è un antimicrobico ad ampio spettro derivato della minociclina; è il primo rappresentante di una nuova classe di antibiotici semisintetici denominati glicilcicline, strutturalmente simili alle tetracicline (Informazioni sui farmaci 2007b).

È molto attiva, in vitro, contro i Gram-positivi resistenti, compresi MRSA, PRP, VRE e contro Gram-negativi, fra cui la maggior parte degli enterobatteri, e anaerobi fra cui *Bacteroides fragilis* e *Clostridium difficile*, sebbene sia meno efficace contro quei Gram-negativi patogeni opportunisti, dotati di pompe di efflusso, come *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. Il suo meccanismo d'azione è lo stesso delle tetracicline: entrata nei batteri attraverso un processo energia-dipendente e legame reversibile alla subunità ribosomiale 30S, l'affinità di legame è maggiore di quella delle tetracicline; il legame blocca l'accesso degli aminoacil t-RNA al sito A nel ribosoma, interrompendo così l'allungamento dei polipeptidi. È considerato un batteriostatico, ma ha dimostrato attività battericida contro patogeni respiratori come *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *L. pneumophila*.

La tigeciclina è attiva contro ceppi dotati di gene *tet*, che codifica per le principali forme di resistenza alle tetracicline, inoltre è molto difficile creare in laboratorio ceppi resistenti, ma resistenza acquisita è già stata dimostrata in *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* e in *Acinetobacter baumannii*.

È indicata per il trattamento delle infezioni complicate della cute e dei tessuti molli e nelle infezioni complicate intraaddominali, soprattutto se si sospetta un'eziologia da *Enterobacteriaceae*. Non ci sono studi che dimostrino una sua superiorità rispetto ad altri antibiotici, di solito efficaci da soli o in combinazione per il trattamento di queste patologie e



molto meno costosi; il suo uso è consigliato quindi solo in caso di fallimento degli altri farmaci o in pazienti allergici.

Valutazioni sono in corso per il suo uso nel trattamento di polmoniti acquisite in comunità e in ambiente ospedaliero (EMEA 2008).

Farmaco	Classe	Azione	Spettro azione	Target
Ertapenem	Carbapenemico	battericida	Gram-negativi e positivi fra cui PSP, <i>S. pyogenes</i> , MSSA, Stafilococchi coag-neg	sintesi parete cellulare
Daptomicina	Lipopeptidi	battericida	Gram-positivi fra cui MRSA, MRSE e PRP	membrana
Moxifloxacina	Fluorochinoloni	battericida	Gram-negativi e positivi anche PRP e VRE	sintesi DNA
Gatifloxacina	Fluorochinoloni	battericida	Gram-negativi e positivi anche PRP e <i>S. pyogenes</i> resistente a macrolidi	sintesi DNA
Quinopristin-Dalfopristin	Streptogramine	battericida	Gram-positivi fra cui anche MRSA, MRSE, PRP, VISA e VRE (non <i>E. faecalis</i> )	sintesi proteica
Telitromicina	Chetolidi	batteriostatico	Gram-positivi fra cui PRP (anche eritromicina-R), MRSA, MRSE, VISA e VRE (solo eritromicina S)	sintesi proteica
Tigeciclina	Glicilcicine	batteriostatico	Gram-positivi anche MRSA e PRP e VRE	sintesi proteica
Linezolid	Oxazolidinoni	batteriostatico	Gram-positivi fra cui anche MRSA, MRSE, PRP, VISA e VRE	sintesi proteica

**Tabella 1.1.** Farmaci di recente introduzione e loro spettro di attività

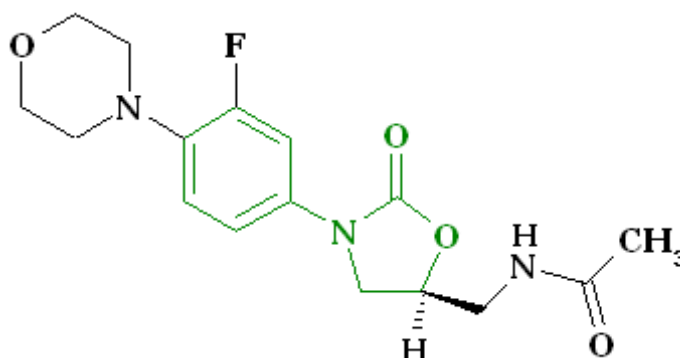
La maggior parte dei nuovi antibiotici è costituita da molecole che sono derivate dalla modifica di principi attivi già esistenti, solo i composti oxazolidinoni appartengono all'unica nuova classe scoperta e introdotta con successo in clinica negli ultimi 35 anni, chimicamente non correlabile a nessun altro agente disponibile in commercio.

### 1.2.2. Linezolid

Il linezolid (Zyvoxid o Zyvox<sup>®</sup>) è il primo componente della classe degli oxazolidinoni ad essere stato approvato per l'uso clinico dal Food and Drug Administration statunitense nel 2000 (nel 2001 in Italia).

### 1.2.2.1. Struttura

La sua formula chimica è  $C_{16}H_{20}FN_3O_4$  e il peso molecolare 337.35. La caratteristica strutturale è rappresentata dal gruppo N-ariloxazolidinone, indicato in verde nella Fig. 1.1, da cui il nome della classe. Tale gruppo è essenziale per l'attività del farmaco, come è indispensabile la configurazione sterica del C-5 e il gruppo C-5 acil-amino-metilico; il sostituente fluoro-aromatico non è critico per l'attività, ma aumenta la potenza e migliora la biodisponibilità; il gruppo morfolinico in posizione para aumenta la farmacocinetica e l'idrosolubilità, riducendo gli effetti tossici.



**Figura 1.1.** Struttura chimica del linezolid: (S)-N-[[3-(3-fluoro-4-morfolinilfenil)-2-oxo-5-oxazolidinil] metil] acetamide (da Klajn 2005)

### 1.2.2.2. Storia

La storia del linezolid è il tipico esempio di quanto tempo sia necessario allo sviluppo di nuove molecole efficaci in campo clinico.

Composti, sulfossidi, appartenenti alla classe degli oxazolidinoni erano già noti alla fine del 1970 per la loro utilità nel trattamento di malattie batteriche e fungine di varie piante (Fig. 1.2, 1), solo più tardi venne delineata l'attività antibatterica dei derivati sulfonamidici (Fig. 1.2, 2), attirando l'interesse della DuPont Pharmaceuticals, che iniziò studi volti ad incrementare questa attività in particolare verso streptococchi e stafilococchi, che cominciarono a creare grossi problemi per l'instaurarsi delle resistenze ai glicopeptidi; le prime molecole però (Dup 721 e 105, Slee 1987; Fig. 1.2, 3), si dimostrarono inadatte allo sviluppo farmaceutico, a causa della loro tossicità e il programma fu abbandonato. Nel 1990 la Upjohn Corporation riprese a considerare questi composti, furono introdotte modifiche strutturali creando analoghi che, pur mantenendo una buona attività antibatterica, neutralizzavano gli effetti tossici (Fig. 1.2, 4). Ulteriori modifiche ad opera della Pharmacia portarono nel 1996 ad altri analoghi, fra i quali, per i primi trials clinici, fu scelto il linezolid, per la sua ottima farmacocinetica. Il

farmaco è stato commercializzato dalla ditta Pfizer, che ha assorbito le due case farmaceutiche precedenti.

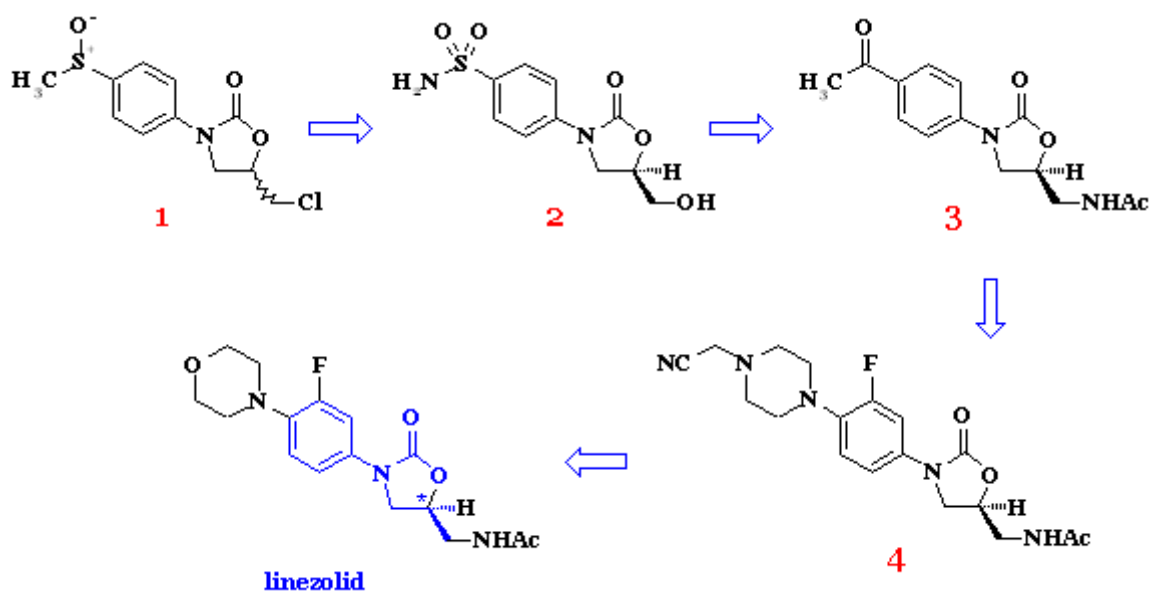


Figura 1.2. Sviluppo del linezolid dai sulfossidi alla molecola attuale (da Klajn 2005)

### 1.2.2.3. Meccanismo d'azione

Il meccanismo d'azione degli oxazolidinoni è unico nel suo genere: essi bloccano la sintesi proteica in una fase molto precoce, inibendo la formazione del complesso d'inizio, attraverso il legame reversibile con l'rRNA 23S della subunità ribosomiale 50S (Klajn 2005, Livermore 2003, Hancock 2005); tale legame in qualche modo altera il sito P deputato al legame del peptidil-tRNA sulla subunità 50S e ciò contrasterà l'adattamento del fMet-tRNA al sito e l'ancoraggio delle due subunità durante la formazione del complesso d'inizio (Fig. 1.3), impedendo di fatto la traduzione del mRNA. I primi studi, volti a localizzare il possibile target, si sono avvalsi dell'archeobatterio alofilo *Halobacterium halobium*, che possedendo un'unica copia genica per l'rRNA 23S permetteva di superare l'ostacolo dovuto alla ridondanza degli operoni per gli rRNA; sui suoi mutanti linezolid-resistenti si è arrivati a ipotizzare che il sito legante fosse localizzato nelle immediate vicinanze del centro attivo della peptidil-transferasi, nell'ansa centrale del domain V del rRNA 23S, senza però inibire l'attività dell'enzima stesso (Kloss 1999). Studi recenti, attraverso crosslinking in vivo di molecole di oxazolidinoni con ribosomi di *S. aureus* e ribosomi umani, associati a modeling molecolare, hanno portato ad una più precisa delucidazione del meccanismo d'azione e del sito di legame: il centro della peptidil-transferasi si conferma come sito principale di azione; il linezolid si lega al ribosoma con il sito P già impegnato, ma, senza apparentemente interagire

con la parte peptidilica, va a posizionarsi nello spazio normalmente occupato dal residuo aminoacilico dell'aminoacil-tRNA legato al sito A; in questo modo viene impedito il legame o il posizionamento corretto dell'aminoacil-tRNA nel sito attivo della peptidil-transferasi (Leach 2007).

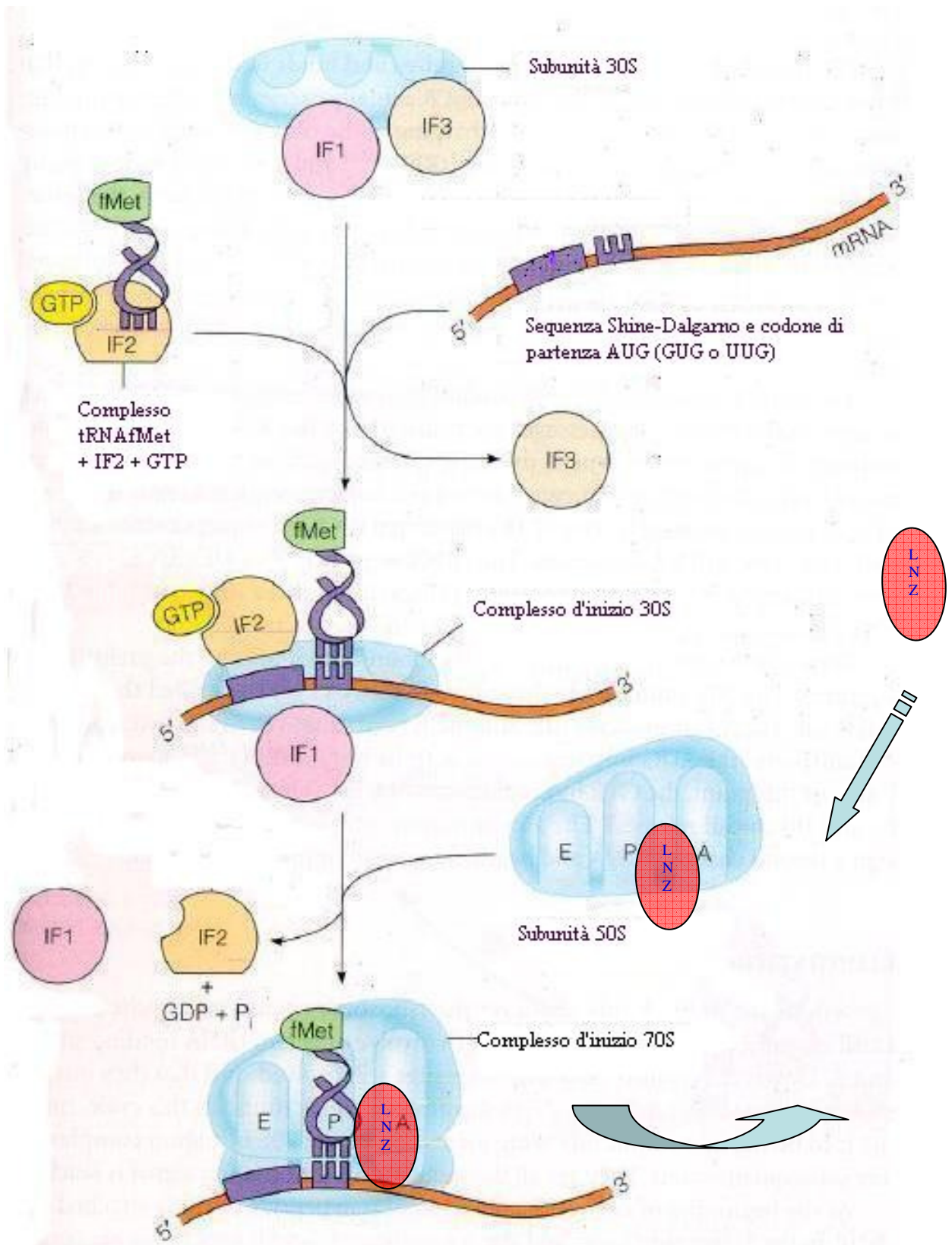
Il blocco della sintesi proteica in una fase così precoce porta a prevenire la sintesi di vari fattori di virulenza, come coagulasi, emolisine, proteina A, di stafilococchi e streptococchi e a non essere suscettibile di resistenza crociata con altri antibatterici, come cloramfenicolo, macrolidi, lincosamidi, streptogramine e tetracicline che agiscono pure sulla sintesi proteica, ma in una fase più tardiva impedendo l'allungamento della catena peptidica. Di recente è stata rilevata la possibilità di una resistenza crociata con cloramfenicolo e quinopristin-dalfopristin (Besier 2008). Bloccare la sintesi proteica sia a livello di complesso d'inizio 70S, sia a livello di allungamento della catena non è letale per i batteri, infatti il linezolid, come gli altri farmaci sopra descritti, è essenzialmente batteriostatico, solo per la maggioranza degli streptococchi, fra cui i pneumococchi, risulterebbe battericida (Zurenko 1996).

#### **1.3.2.4. Spettro d'azione**

Il linezolid è particolarmente attivo contro batteri Gram-positivi, compresi stafilococchi coagulasi-negativi anche meticillino-resistenti, *S. aureus* resistente alla meticillina e resistente o con sensibilità intermedia ai glicopeptidi (GISA), enterococchi anche vancomicina-resistenti, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, streptococchi viridanti e *S. pneumoniae* anche resistenti a penicillina e cefalosporine. Il farmaco è inoltre attivo su *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp. e *Listeria monocytogenes*; alcuni anaerobi sono sensibili al linezolid come *Clostridium perfringens* e *C. difficile*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium acnes* e *Fusobacterium*.

I Gram negativi sono generalmente resistenti: i loro ribosomi si legano al linezolid, ma la molecola viene riconosciuta ed espulsa dalla cellula tramite pompe di efflusso endogene (Swaney 1998a). *Bacteroides* spp., *Moraxella catharralis* e *Pasteurella* spp. hanno una sensibilità relativamente ridotta, MIC di 4-8 µg/ml, come *Haemophilus influenzae*, MIC 16 µg/ml.

Sembra possedere una certa attività contro *Chlamidia* e *Mycoplasma*, anche se sono stati descritti ceppi di *Mycoplasma pneumoniae* resistenti; si dimostrano invece sensibili le varie specie di micobatteri fra cui anche il *M. tuberculosis* multiresistente



**Figura 1.3.** Meccanismo d'azione del linezolid: la molecola si lega alla subunità 50S del ribosoma procariotico impedendo il suo assemblaggio al complesso 30S. In questo modo non si formerà un complesso d'inizio 70S funzionale e la sintesi proteica risulterà bloccata (da [bass.bio.uci.edu/.../lecture23/hudel\\_27\\_18.jpg](http://bass.bio.uci.edu/.../lecture23/hudel_27_18.jpg), modificata).

### 1.3.2.5. Resistenze

Essendo un prodotto di sintesi, non c'è un serbatoio naturale di resistenza; tutti gli altri inibitori della sintesi proteica sono derivati da antibiotici naturali di origine microbica, i cui produttori sono la riserva naturale di geni di resistenza, che poi possono essere acquisiti per trasmissione orizzontale dai ceppi clinici. Studi in vitro, precedenti al brevetto, avevano dimostrato che era difficile selezionare ceppi resistenti al linezolid, probabilmente per una bassa frequenza di mutazione spontanea dell'ordine di  $10^{-9}$  –  $10^{-11}$  (Kaatz 1996, Zurenko 1996) e che era possibile ottenere solo una bassa frequenza di mutanti linezolid-resistenti in *S. aureus* ed enterococchi con piastre a gradiente (Zurenko 1996) o attraverso vari passaggi in terreni con concentrazioni crescenti di linezolid (Prystowsky 2001). Con la sperimentazione clinica iniziano a comparire, ma molto sporadicamente, i primi ceppi linezolid-resistenti, dapprima fra gli enterococchi (Gonzales 2001), poi rarissimi casi in *S. aureus* (Tsiodras 2001) e successivamente anche in stafilococchi coagulasi-negativi (Kelly 2006) e in *S. pneumoniae* (Wolter 2005); non sono stati riportati casi di resistenza in altri streptococchi.

I **fattori di rischio**, che possono essere associati all'isolamento di ceppi resistenti al linezolid, sono comuni all'insorgenza di resistenze verso altri farmaci: ospedalizzazione prolungata e passaggio in vari reparti, soprattutto rianimazioni e reparti di chirurgia; maggiori terapie antibiotiche cumulative e in particolare uso di carbapenemici o piperacillina-tazobactam e/o cefepime; trattamenti prolungati con linezolid; precedenti infezioni da MRSA, infezioni da VRE in pazienti con malattie vascolari periferiche o in trapiantati e in nutrizione parenterale (Pogue 2007). Le infezioni da MRSA, in particolare, restano fattori importanti anche in assenza di terapia con linezolid (Keiner 2007). La comparsa di mutanti resistenti è proporzionale alla dose di farmaco usata, alla durata della somministrazione (Bourgeois-Nicolaos 2007) e al suo consumo (Scheetz 2008).

Sono state descritte varie **mutazioni sito-specifiche**, che conferiscono resistenza al linezolid, modificando il sito di legame, sia in vitro che in vivo; tutte si localizzano nella regione, piuttosto conservata e compresa fra i nucleotidi 2042 e 2628 (secondo la numerazione in *E. coli*), della peptidil-transferasi sull'rRNA 23S ad ulteriore conferma del meccanismo di azione della molecola.

In vitro sono state evidenziate varie mutazioni in ceppi Gram-positivi: G2576U e G2447U in *S. aureus* (Swaney 1998b); G2505A in *E. faecium* e G2576U, C2512U, G2513U e C2610G in *E. faecalis* (Prystowsky 2001); G2505A in *E. faecalis* (Lobritz 2003); quest'ultima è stata selezionata anche in vivo in *E. faecalis* colonizzanti topi gnotobiotici trattati con linezolid (Bourgeois-Nicolaos 2007).

In ambiente clinico la mutazione di gran lunga predominante è la transversione G2576T nel gene per l'rRNA 23S sia fra gli enterococchi, che in *S. aureus* (Tsiodras 2001, Meka 2004b); solo in *S. aureus* è stata evidenziata un'altra mutazione, T2500A, sempre localizzata nel gene per l'rRNA 23S (Meka 2004b).

Alcune delle mutazioni che conferiscono resistenza in vitro riguardano nucleotidi che interagiscono direttamente con il linezolid, mentre G2576 non è a diretto contatto con il farmaco; è stato dimostrato che però aiuta, attraverso un legame H, a stabilizzare altri due residui che contattano la molecola del farmaco; la transversione G2576U impedisce tale stabilizzazione e i due nucleotidi acquistano molta più flessibilità rendendo difficile il contatto con i tre anelli del linezolid (Leach 2007).

Benchè in vitro si siano dimostrate possibili varie mutazioni, il fatto che in vivo solo una sia stata evidenziata in larga maggioranza porterebbe a supporre che in qualche modo l'ambiente sanitario favorisca la mutazione G2576T.

I geni che codificano per gli rRNA (16S, 23S e 5S) sono organizzati in operoni, che contengono anche i geni per i tRNA, assicurando così la trascrizione coordinata e la produzione di quantità equimolari di ogni prodotto genico; essi differiscono dalla maggior parte degli altri geni cromosomiali dei procarioti perchè sono presenti in copie multiple nel genoma, arrivando fino a 15.

Studi sul genoma batterico dei Gram-positivi (Pillai 2002, Marshall 2002, Klappenbach 2001) hanno rilevato che *S. aureus* possiede da 4 a 7 operoni per gli rRNA, di solito 5; *E. faecium* può avere fino a 7 operoni, generalmente 6; *E. faecalis* sempre 4, come *S. pneumoniae*.

Vista la variabilità nel numero di copie di rDNA 23S, si potrebbe supporre che lo sviluppo di resistenza, ad alto livello, al linezolid sia più difficile nelle specie dotate di un numero maggiore di copie. In realtà se ciò può essere vero in vitro, dove è stato rilevato che *E. faecalis* sviluppa molto più velocemente, e a livelli maggiori di *E. faecium*, la resistenza al linezolid (Prystowsky 2001), un riesame dei dati in letteratura riguardanti ceppi clinici ha messo in evidenza che la resistenza si manifesta con più **frequenza** in *E. faecium*, seguito da *E. faecalis* e a distanza da *S. aureus*.

Potrebbero essere implicati i meccanismi di riparazione del DNA (Martinez 2009), quali i peptidi appartenenti alle famiglie MutS e MutL; tali peptidi aiutano a ripristinare i nucleotidi corretti, in seguito ad un'introduzione errata durante la replica del DNA e inibiscono la ricombinazione tra sequenze non identiche, mantenendo così la stabilità genomica. Mutazioni nei loci *mutS* e *mutL* sono associate a fenotipi ipermutabili in varie specie batteriche e potrebbero essere implicate nell'emergenza dell'antibiotico-resistenza; non è però stato

dimostrato che mutazioni comportanti variazioni in questi peptidi siano in qualche modo responsabili della resistenza al linezolid in ceppi di *E. faecium* (Willems 2003).

È più probabile che la maggior frequenza di ceppi clinici di *E. faecium* linezolid-resistenti sia dovuta alla propagazione della resistenza alla vancomicina, molto più diffusa fra gli *E. faecium*, e al conseguente uso del linezolid per eliminare i VRE.

È stato dimostrato che, mentre la comparsa della mutazione nella prima copia di geni per rRNA 23S è piuttosto lenta, legata alla bassa frequenza di mutazione spontanea, la successiva estensione della mutazione alle altre copie avviene molto più rapidamente (Besier 2008) e ciò potrebbe essere spiegato con un altro meccanismo presente in specie dotate di ridondanza genomica.

Le copie multiple mantengono alta omogeneità attraverso i meccanismi di **conversione genica** (Hashimoto 2003), cioè ricombinazione omologa, non reciproca, tra alleli mutanti e wild-type (wt) di un gene. La conversione genica entra in gioco anche nelle resistenze: è stato riportato l'aumento del grado di resistenza agli aminoglicosidi in *Mycobacterium smegmatis* (Prammananan 1999) sotto pressione selettiva in presenza dell'antibiotico, e l'amplificazione della resistenza alla tetraciclina in *E. faecalis* wild-type, annullata nello stesso ceppo RecA-prodotto in laboratorio (Yagi 1980); altro esempio è la resistenza ai macrolidi in *S. pneumoniae* (Wolter 2006). Gli alleli wt si convertono in alleli mutati per ricombinazione omologa con alleli che già presentano la mutazione; tale processo è mediato da RecA ed è stato riportato che ceppi RecA- possono acquisire, per mutazione spontanea, in una copia genica di rDNA 23S la transversione G2576T, ma non possono poi trasferire la mutazione alle altre copie (Lobritz 2003). Il processo di conversione genica potrebbe spiegare anche la discordanza nella stabilità della resistenza: resistenza stabile in assenza di antibiotico riscontrata in *S. aureus* (Pillai 2002), dove tutte le 5 copie di rDNA 23S presentavano la mutazione G2576T e resistenza non stabile, con ceppi che da resistenti riacquistavano la sensibilità dopo vari passaggi in terreni senza antibiotico (Meka 2004a), dove solo parte delle copie di rDNA 23S erano mutate. Perché avvenga la conversione è necessaria la presenza di entrambi gli alleli wt e mutati e quindi solo in questo caso sarà possibile, da un lato il passaggio ad una resistenza più elevata (conversione wt→mutati), in seguito alla pressione selettiva del principio attivo e dall'altro il ritorno alla sensibilità (conversione mutati→wt), dopo sospensione del farmaco (Meka 2004b); se non esistono alleli wt non si potrà tornare al genotipo sensibile. Tale spiegazione non è stata confermata dal lavoro sulla resistenza ai macrolidi in *S. pneumoniae*, dove sembra possibile il ritorno veloce alla sensibilità, in assenza di antibiotico, a partire da ceppi con tutte le copie mutate (Wolter 2006). La discrepanza in



questo caso viene spiegata con la possibilità che esista un numero piccolo, non rilevabile, di cellule batteriche nella popolazione dotate di alleli wt.

La presenza di copie multiple di geni per rRNA 23S suggerisce che ci sia una dipendenza diretta fra il numero delle copie che presentano la mutazione e il livello di resistenza e infatti numerosi sono i lavori nei quali viene descritto il **rapporto fra il grado di resistenza** verso il linezolid, espresso come MIC, **e il numero di copie** con la mutazione G2576T, sia in isolati clinici che in mutanti selezionati in vitro. In ceppi di *E. faecium* e *E. faecalis* clinici la MIC cresceva da 2 µg/ml in quelli privi di mutazioni a 64 o 256 µg/ml in quelli in cui la maggior parte o la totalità delle copie presentavano la mutazione (Marshall 2002, Ruggero 2003). Anche ceppi sensibili potevano presentare eterozigosi nella posizione 2576, ciò implica che, perchè ci sia l'espressione fenotipica della resistenza, è necessario che più di una copia di geni presenti la mutazione (Marshall 2002, Bourgeois-Nicolaus 2007); ceppi di *E. faecalis* linezolid-resistenti selezionati in vitro presentavano MIC da 4 a 128 µg/ml con l'estensione della mutazione da 2 alla totalità delle 4 copie di geni per l'rRNA 23S (Lobritz 2003); ancora aumento delle MIC proporzionale all'aumento delle copie mutate è stato descritto, in vivo, in *E. faecalis* isolato da topi gnotobiotici alimentati con differenti dosi di linezolid (Bourgeois-Nicolaus 2007) e in mutanti resistenti, selezionati in vitro, di un ceppo clinico di *S. aureus* (Besier 2008).

I dati reperibili in letteratura per la **fitness** in caso di resistenza al linezolid sono controversi: in *E. faecalis* si è riportata una dipendenza dal numero di copie mutate dell'rRNA 23S, con un vantaggio se tutte le copie erano mutate e, inspiegabilmente, svantaggio se solo una era portatrice della mutazione (Bourgeois-Nicolaos 2008); invece una correlazione inversa fra numero di copie mutate e velocità di crescita è stata riportata per un ceppo RecA+, mentre per il corrispondente RecA- i mutanti avevano velocità maggiore del wt (Lobritz 2003); in *S. aureus* un ceppo mutante presentava curve di crescita sovrapponibili ai ceppi privi di mutazione (Pillai 2002), mentre sempre in *S. aureus* l'estensione progressiva della mutazione alle varie copie è stata accompagnata da una diminuzione di fitness (Besier 2008).

Anche i dati riguardanti la **stabilità della mutazione**, reperibili in letteratura, sono controversi: in un isolato clinico di MRSA resistente al linezolid, per mutazioni coinvolgenti tutte le 5 copie di rRNA 23S, 15 passaggi in terreno privo di antibiotico non erano sufficienti a diminuire la resistenza (Pillai 2002); *E. faecalis* e *E. faecium* vancomicina-resistenti, selezionati per la linezolid-resistenza in vitro, mantenevano la resistenza dopo un mese di coltura in terreno senza antibiotico (Prystowsky 2001); in un isolato clinico di *S. aureus*, con 4 su 5 copie mutate e MIC di 16 µg/ml, 60 passaggi in terreno senza antibiotico

determinavano la scomparsa progressiva della mutazione e la diminuzione della MIC da 8 µg/ml, con solo 2 su 5 copie mutate, a 2 µg/ml con 1 su 5 copie mutata, confermando nuovamente il rapporto fra numero di copie mutate e grado di resistenza (Meka 2004a); 50 passaggi in terreno privo di antibiotico di un ceppo di *S. aureus*, linezolid-resistente a causa della mutazione estesa a tutte 5 le copie di rRNA 23S, hanno provocato la diminuzione della MIC e la scomparsa della mutazione da una delle copie (Besier 2008).

Recentemente sono stati scoperti **altri due meccanismi di resistenza**: uno coinvolge ancora una mutazione, che porta ad una delezione di due aminoacidi nella riboproteina L4 in *Streptococcus pneumoniae* e l'altro, molto più preoccupante perchè trasmissibile, identifica ceppi di *S. aureus* resistenti al linezolid per la presenza del gene *cfr*.

La delezione di 6bp nel gene codificante per la riboproteina L4 in *S. pneumoniae* (Wolter 2005) provoca la modificazione del sito bersaglio di vari antibiotici; la proteina L4 è probabilmente parte integrante del sito legante, la sua modifica, con la delezione di due aminoacidi, provoca la perturbazione della struttura tridimensionale dell'rRNA 23S e di conseguenza viene ad essere modificato il sito legante comune a linezolid, eritromicina, clindamicina e cloramfenicolo, riducendo la sensibilità a questi antibiotici. Questo nuovo meccanismo di ridotta sensibilità apre quadri preoccupanti perchè sono già state riportate mutazioni in L4 che conferiscono resistenza ai macrolidi in *S. aureus* e che potrebbero essere responsabili di ridotta sensibilità al linezolid; la medesima delezione in L4 è stata riportata anche in streptococchi di gruppo A (Bingen 2002).

Resistenze non mutazionali agli oxazolidinoni, dovute ad un gene codificante per una rRNA metiltransferasi (gene *cfr*, identifica la resistenza al cloramfenicolo e florfenicolo), sono state riportate in ceppi di stafilococchi isolati in campo veterinario; il gene *cfr* era localizzato su plasmidi e poteva essere trasferito orizzontalmente ad altri ceppi di stafilococchi. Si ipotizza che l'acquisizione di questo gene possa essere stata indotta dall'uso del florfenicolo nell'industria veterinaria. Il meccanismo della resistenza a linezolid e cloramfenicolo dovuta al *cfr* implicava la metilazione di A2503 nel rRNA 23S, compreso nel sito legante il linezolid. La presenza dello stesso gene *cfr* determinava anche la resistenza al linezolid in MRSA clinici; nei ceppi clinici il gene era localizzato nel cromosoma batterico, probabilmente come parte di un plasmide integrato ma capace di mobilizzazione; in particolare formava un'unità trascrizionale con il gene *erm(B)* denominata operon *mlr* (Toh 2007). Dato che il gene *erm* conferisce resistenza, attraverso un'altra rRNA metilasi, a macrolidi, lincosamidi e streptogramine B, la presenza dell'associazione nell'operon *mlr* (modification of the large

ribosomal subunit) rendeva l'isolato resistente a tutti gli antibiotici il cui target è situato nella subunità ribosomiale 50S. Non è stata individuata la fonte da cui i geni *erm* e *cfr* sono originati, ma è molto probabile che provengano da un microrganismo produttore di uno degli inibitori naturali delle peptidil-transferasi; non viene esclusa la trasmissione orizzontale da ceppi di enterococco (Toh 2007).

#### **1.3.2.6. Informazioni cliniche e terapeutiche**

Il linezolid è disponibile in soluzione iniettabile (2 mg/ml), in compresse (400 o 600 mg) e in granuli per sospensione orale (100 mg/5 ml).

La biodisponibilità è ottima, molto vicina al 100%, sia per via parenterale che per via orale, per cui dalla somministrazione endovena si può passare alla formulazione orale, senza necessità di cambiare le dosi, non appena la condizione clinica lo consenta; il paziente, potrà essere dimesso e continuare il trattamento a domicilio, abbreviando così la durata dei ricoveri ospedalieri con molteplici vantaggi, quali un minor pericolo di acquisizione di infezioni ospedaliere e un minor costo per la struttura che potrà bilanciare il costo elevato del farmaco.

Solitamente il farmaco viene somministrato alla dose di 600 mg due volte al giorno; viene assorbito rapidamente e raggiunge il picco massimo di concentrazione dopo 1 o 2 ore, ma un livello plasmatico > 4 mg/L viene mantenuto durante tutto l'intervallo di dosaggio, livello superiore al breakpoint di sensibilità per le specie batteriche contro cui il linezolid viene usato (Dresser 1998, Zyvox 2005 e Zyvoxid 2007).

Studi di farmacocinetica hanno dimostrato che il linezolid si lega alle proteine plasmatiche per circa il 30%; arriva prontamente a tutti i tessuti ben irrorati e nel liquido cefalorachidiano (Milestone 2007).

Viene metabolizzato nel fegato attraverso l'ossidazione dell'anello morfolinico con la produzione di due metaboliti inattivi; il 30% viene escreto nelle urine in forma inalterata, mentre non vi è traccia nelle feci; i metaboliti non hanno una tossicità significativa e il farmaco quindi può essere somministrato anche in caso di insufficienza renale. Il citocromo P450 non sembra coinvolto nella sua biotrasformazione.

Secondo le note informative, diramate dall'agenzia italiana del farmaco e concordate con le autorità regolatorie europee, il Zyvoxid è indicato per il trattamento delle polmoniti acquisite in comunità e per le polmoniti nosocomiali causate da batteri Gram-positivi; è indicato anche per le infezioni complicate della cute e dei tessuti molli, solo quando sia accertato che la causa dell'infezione è determinata da batteri Gram-positivi sensibili e, qualora esistano coinfezioni da Gram-negativi, deve essere usato solo se non sono disponibili altre alternative terapeutiche e comunque in associazione con un trattamento specifico per i Gram-negativi isolati. La sua

efficacia nelle endocarditi da MRSA o enterococchi resistenti, dove è richiesta un'elevata attività battericida, è ancora da valutare. Viene sottolineato che il trattamento deve essere iniziato in ambito ospedaliero, dopo un consulto con uno specialista infettivologo o microbiologo, mentre è scoraggiato l'uso empirico proprio per evitare l'insorgere di ceppi resistenti.

Di solito il farmaco è ben tollerato: fra i pochi effetti indesiderati ci sono casi di mielosoppressione con anemia, leucopenia, pancitopenia e soprattutto trombocitopenia, il rischio però sembra essere legato alla durata del trattamento e comunque i parametri ritornano ai livelli normali con la sospensione del trattamento; la causa di questi effetti collaterali potrebbe ricollegarsi alla capacità del farmaco di legarsi ai ribosomi mitocondriali inibendo la sintesi proteica dei mitocondri, mentre sembra impedito il suo legame ai ribosomi citoplasmatici (Leach 2007). Sono stati anche riportati casi di neuropatia periferica e ottica che può portare a perdita di vista, ma solo in pazienti trattati per un periodo superiore alla durata massima raccomandata che è di 28 giorni. Le reazioni avverse al farmaco più comuni sono cefalea, diarrea, nausea e candidiasi, ma solo nel 3% dei casi si arriva alla sospensione del trattamento.

È un inibitore reversibile e non selettivo delle monoamino-ossidasi e potenzialmente può interagire con agenti adrenergici e serotoninergici.

### **1.3. Gli Enterococchi**

#### **1.3.1. Descrizione**

Gli Enterococchi sono cocchi Gram-positivi, catalasi-negativi, anaerobi facoltativi; possono crescere a temperature che vanno da 10 a 45°C, ma la loro temperatura ottimale è 35°C; sono capaci di idrolizzare l'esculina in presenza di sali biliari e questa loro caratteristica è stata sfruttata per la produzione di terreni selettivi, che inibiscono la crescita di altri microrganismi (terreni agarizzati alla bile-esculina o BEA); sono classificabili per la gran parte nel gruppo sierologico D di Lancefield. Sono microrganismi molto resistenti, capaci di sopravvivere in ambienti ostili e sono praticamente ubiquitari. Negli uomini si trovano principalmente nel tratto gastrointestinale; la specie più comune e abbondante è *Enterococcus faecalis*, anche se possono essere presenti altre specie come *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* in proporzioni variabili a seconda di vari fattori fra cui età, dieta e condizioni fisiologiche (Martins Teixeira 2003).

Di solito sono batteri colonizzanti, innocui componenti della flora commensale, non è escluso anzi un loro intervento nella stimolazione delle difese organiche (Benyacoub 2003); in

condizioni particolari si possono trasformare in patogeni opportunisti e sono una delle cause più frequenti di infezioni nosocomiali associate spesso a stati infettivi gravi e difficilmente trattabili.

Non sono dotati di particolare virulenza, ma causano infezioni, principalmente a carico delle vie urinarie, sono anche importante causa di batteriemie, endocarditi e meningiti; sono comuni causa di infezione nei soggetti portatori di cateteri, sia urinari che vascolari, e sono associati a infezioni di ferite e dei siti pelvici e intra-addominali, anche se spesso in questi casi si tratta di infezioni polimicrobiche e la significatività dell'isolamento di enterococchi deve essere presa con cautela.

Ne esistono più di 40 specie, ma *E. faecalis* è quello più frequentemente isolato nei campioni clinici: in Italia più del 78% delle batteriemie sono imputabili a *E. faecalis*, seguito da *E. faecium* con il 28% (Alfonsi 2007).

La caratteristica che li rende pericolosi patogeni opportunisti è determinata dalla loro resistenza naturale a molti antibatterici di uso comune, e dalla facilità ad acquisire resistenze ai chemioterapici.

Sono intrinsecamente resistenti agli aminoglicosidi a basse concentrazioni, ai  $\beta$ -lattamici (penicilline resistenti alle penicillinasi, cefalosporine), alle sulfonamidi, rendendo necessario, per i trattamenti terapeutici, in caso di infezioni gravi, il ricorso ad associazioni fra un agente attivo sulla cell-wall,  $\beta$ -lattamico (penicillina) o glicopeptide (vancomicina), con un aminoglicoside (gentamicina o streptomicina).

Possono risultare sensibili, nei test in vitro, a trimethoprim-sulfametoxazolo, ma in vivo tale farmaco non si dimostra attivo; i patterns di resistenza variano fra le specie, ciò rende necessaria un'accurata identificazione a livello di specie e un'attenta valutazione degli antibiogrammi (Martins Teixeira 2003, Swenson 2003, Clinical and Laboratory Standards Institute 2007)

Possono acquisire diversi determinanti di resistenza che precludono l'uso di altri antibiotici quali cloramfenicolo, tetracicline, macrolidi, lincosamidi e streptogramine, chinoloni e possono acquisire anche la resistenza ad alte dosi di aminoglicosidi; spesso la vancomicina resta l'unica opzione terapeutica possibile, ma in ambienti ospedalieri ad alto rischio infettivo, non è tardata la comparsa di batteri resistenti anche a questo antibiotico, complice l'uso esteso di glicopeptidi.

Sono fra le specie batteriche a più lunga sopravvivenza in condizioni sfavorevoli e ciò, aggiunta alle altre caratteristiche, fa di loro una vera minaccia: sono riportate sopravvivenze superiori ai 60 giorni sulle superfici e oggetti a contatto con i pazienti, se non vengono

effettuate idonee disinfezioni (Gastmeier 2006) e ciò vale anche per i ceppi resistenti, che sono stati isolati da quasi tutte le superfici compresi telecomandi, stetoscopi, manicotti per la misura della pressione, termometri, dispenser automatici di medicazioni e pavimenti (Granlund 2006), incrementando la possibilità di una loro trasmissione.

### 1.3.2. VRE

La vancomicina fu scoperta nel 1952 dalla Eli Lilly, che aveva attivato un programma di studio di nuovi farmaci attivi verso gli stafilococchi resistenti alla penicillina; fu visto che una sostanza prodotta dallo *Streptomyces orientalis* era attiva contro la maggior parte dei Gram-positivi, verso alcuni anaerobi, fra cui *Clostridium difficile* e verso *Neisseria gonorrhoeae*. Il prodotto venne purificato e i primi trials clinici dimostrarono la sua validità; venne approvata per l'uso clinico nel 1958 dal FDA, vista la mancanza di altri farmaci efficaci, che però furono scoperti proprio nel 1958 e negli anni seguenti (meticillina e prime cefalosporine). Data la sua tossicità (febbre, flebiti nel sito di iniezione, brivido, oto e nefrotossicità rare, arrossamento di viso, collo e torace in caso di rapida infusione) venne riservata solo ai casi resistenti ai nuovi farmaci o per i pazienti allergici ai  $\beta$ -lattamici. L'uso della vancomicina crebbe enormemente dopo il 1980, per due motivi: fu considerato il farmaco ideale per la cura dell'enterocolite pseudomembranosa, malattia causata da *C. difficile*, ma anche da *S. aureus*; ed era l'unica alternativa farmacologica contro ceppi resistenti (MRSA e *S. pneumoniae* resistente alla penicillina), che ormai stavano comparendo dovunque (Levine 2006).

La vancomicina è strutturalmente un glicopeptide e il suo target è il dipeptide terminale D-Ala-D-Ala dei precursori del peptidoglicano; i siti di legame sono localizzati nella parte peptidica della molecola e l'interazione impedirà il loro assemblaggio alla catena nascente con la conseguente inibizione della formazione dei legami crociati; la vancomicina non penetra nel citoplasma e l'interazione ha luogo solo dopo la traslocazione dei precursori sulla superficie esterna della membrana; a differenza della penicillina, la vancomicina si lega al substrato, non ad un enzima durante la sintesi del peptidoglicano e quindi la sua attività sarà definita non dall'affinità per un enzima bersaglio, ma dalla specificità di substrato degli enzimi che determinano la struttura dei precursori del peptidoglicano.

Con la delucidazione del meccanismo d'azione della vancomicina si pensava che la possibilità di sviluppo della resistenza fosse un evento remoto, data la specificità dell'interazione del farmaco con D-Ala-D-Ala: sarebbero state necessarie drastiche modifiche nella struttura del peptidoglicano e quindi degli enzimi deputati alla sua sintesi; tali modifiche avrebbero implicato mutazioni multiple; eppure i batteri hanno evoluto sofisticati meccanismi eliminando le vie sintetiche, che portavano ai precursori sensibili e sostituendole con quelle

che sintetizzavano precursori con scarsa affinità per il farmaco (Courvalin 2008). Con il suo uso massiccio e soprattutto con la somministrazione per via orale, dopo il 1980 iniziarono a comparire le resistenze: il primo caso fu riportato in Europa nel 1986, poi negli Stati Uniti, ma successivamente gli enterococchi vancomicina-resistenti si sono diffusi a velocità sorprendente in tutto il mondo.

La resistenza alla vancomicina è dovuta all'acquisizione di vari operoni, i più comuni sono quelli che corrispondono ai fenotipi VanA e VanB; fa eccezione il fenotipo VanC che è costitutivo. La fonte originale da cui si è evoluta questa resistenza non è chiara, probabilmente non si tratta di un evento recente; possono essere implicati microrganismi usati per la produzione industriale dei glicopeptidi, nei quali sono stati trovati geni omologhi (*Streptomyces toyocaensis* e *Amycolatopsis orientalis*), o progenitori ancestrali, o batteri anaerobi della microflora intestinale che possono fungere da intermediari.

Gli operoni codificano per enzimi che portano alla sintesi di precursori a bassa affinità, quindi modificano il bersaglio a cui il farmaco si lega, e che portano all'eliminazione dei precursori ad alta affinità, normalmente prodotti dall'ospite, quindi eliminano il bersaglio.

È un meccanismo piuttosto complesso, in quanto richiede non solo la creazione di nuove vie sintetiche, ma anche l'eliminazione, anche parziale, delle vie sintetiche che portano al target sensibile, ed è il meccanismo sviluppato in particolare dagli enterococchi.

La modifica del bersaglio viene raggiunta con due strategie: una porta ad un elevato livello di resistenza, tipico dei fenotipi VanA, VanB e VanD, con la sostituzione dell'acil-D-Ala-D-Ala con l'acil-D-Ala-D-lattato (D-Lac), portando ad una diminuzione di 1000 volte nell'affinità della vancomicina per il substrato; l'altra strategia porta ad una resistenza a basso livello, tipica dei fenotipi VanC, VanG e VanE, implica la sostituzione del D-Ala-D-Ala con un dipeptide diverso D-Ala-D-Ser e porta ad una diminuzione di 6 volte dell'affinità (Courvalin 2006, Reynolds 2005).

Sono stati descritti sei tipi di resistenza:

**VanA:** determina una resistenza inducibile ad alti livelli alla vancomicina ( $MIC \geq 64 \mu\text{g/ml}$ ) e alla teicoplanina ( $MIC \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ). È la prima resistenza descritta ed è legata al trasposone Tn1546 che codifica per 9 polipeptidi, di cui due deputati alla sintesi del D-Ala-D-Lac, due deputati all'idrolisi dei precursori che terminano con D-Ala, due con funzioni di regolazione, due per la trasposizione e uno a funzione ignota (Courvalin 2006, Reynolds 2005). Il cluster genico *vanA* è stato trovato principalmente in *E. faecium* e in *E. faecalis*, ma può essere ritrovato anche in *E. avium*, *E. durans*, *E. raffinosus* e in *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* che in questo caso acquisiranno elevata resistenza ai due glicopeptidi.

Negli isolati clinici questo tipo di resistenza è mediato dal trasposone Tn1546 o da elementi genetici correlati, localizzati su plasmidi indipendenti o occasionalmente nel cromosoma in grandi elementi coniugativi; i plasmidi, che hanno acquisito per trasposizione gli elementi correlati al Tn1546, sembrano maggiormente implicati nella diffusione della glicopeptide-resistenza fra i microrganismi e sembra che un grosso aiuto alla sua diffusione in Europa sia venuto dall'uso dell'avoparcina, un analogo della vancomicina, negli allevamenti (Jensen 1999).

**VanB:** determina resistenza inducibile alla vancomicina (MIC da 4 a 1024 µg/ml), ma mantiene la sensibilità alla teicoplanina. L'organizzazione del cluster *vanB* è simile a quella del *vanA*, ma differisce per la regolazione in quanto l'induzione sarà data solo dalla vancomicina e non dalla teicoplanina; si riconoscono tre sottotipi del cluster genico *vanB*: *vanB1*, *vanB2* e *vanB3* in base a differenze nella sequenza, ma non c'è correlazione con il livello di resistenza. I cluster *vanB* sono generalmente inseriti in grandi elementi (90-250 kb) che vengono trasferiti per coniugazione da cromosoma a cromosoma anche se è stata riportata l'inserzione in plasmidi; la propagazione della resistenza di questo tipo sembra sia dovuta in gran parte al cluster *vanB2* inserito in trasposoni correlati al Tn916, ma altri trasposoni simili sono stati identificati in ceppi resistenti europei, come il Tn5382 in Spagna (Torres 2006, Granlund 2006) e negli Stati Uniti.

**VanD:** è stato rilevato in rari casi; si tratta di resistenza costitutiva a livelli moderati per entrambi i glicopeptidi (MIC da 64 a 128 µg/ml per vancomicina e da 4 a 64 µg/ml per teicoplanina); i geni sono localizzati a livello cromosomico. Tale tipo di resistenza non è trasferibile per coniugazione ad altri enterococchi (Courvalin 2006, Reynolds 2005).

**VanC:** determina resistenza intrinseca, a basso livello per la vancomicina (MIC da 2 a 32 µg/ml) e sensibilità alla teicoplanina. È stata rilevata dapprima in *E. gallinarum*, che la esprime costitutivamente, ma la sua espressione può anche essere inducibile; successivamente è stata dimostrata in *E. casseliflavus*/*E. flavescens*; questi enterococchi sono presenti nel tratto gastrointestinale e, sebbene raramente, possono causare infezioni di solito dopo interventi chirurgici. Il cluster genico *vanC* è cromosomico e comprende tre geni: *vanT*, *vanC* e *vanXYc*, due portano alla sintesi di D-Ala-D-Ser e uno all'idrolisi dei precursori che terminano con D-Ala (Courvalin 2006, Reynolds 2005).

**VanG:** resistenza a basso livello (MIC 12-16 µg/ml) rilevata in *E. faecalis*, è di tipo cromosomico e implica un cluster di 8 geni acquisiti da vari operoni *van*, il trasferimento di questo tipo di resistenza è determinato dal movimento da cromosoma a cromosoma di un grosso elemento genetico di circa 240 kb che codifica anche per la resistenza all'eritromicina,



mediata da *ermB*; stranamente viene mantenuto un precursore ancora sensibile alla vancomicina (Courvalin 2006, Reynolds 2005).

**VanE:** anche questa resistenza a basso livello (MIC 16 µg/ml) è stata rilevata in *E. faecalis*, è una resistenza di tipo cromosomico, che implica l'intervento di 5 geni, non trasferibile per coniugazione; è molto simile alla resistenza VanC, dalla quale probabilmente è derivata in epoche remote; le differenze riguardano solo l'attività relativa degli enzimi (Reynolds 2005).

Uno dei maggiori pericoli determinati dai VRE è la loro potenziale capacità di trasferire geni R ad altre specie di Gram-positivi: la propagazione della resistenza ai glicopeptidi a batteri più patogeni come gli stafilococchi è già stata documentata, sia in ceppi clinici (Clark 2005), che, in vitro, con il trasferimento da *E. faecalis* a *S. aureus* del cluster *vanA*; sono ancora poche le segnalazioni di *S. aureus* resistente ai glicopeptidi, ciò potrebbe essere dovuto alla inefficiente replica dei plasmidi enterococcici negli stafilococchi e alla conseguente espressione a basso livello della resistenza, probabilmente di difficile identificazione, con i normali sistemi per testare la sensibilità agli antibiotici (Wootton 2007).

Benchè *E. faecalis* sia l'agente maggiormente responsabile di infezioni nosocomiali, la comparsa di fenotipi resistenti ai glicopeptidi, in particolare alla vancomicina (fenotipo VanB), era in passato piuttosto sporadica, mentre più frequente era la comparsa di resistenza ai glicopeptidi in *E. faecium*; negli anni recenti, invece, si assiste all'aumento di resistenza anche negli *E. faecalis* e ad un preoccupante shift dal fenotipo VanB al fenotipo VanA, resistente sia alla vancomicina che alla teicoplanina (Oprea 2004); il sequenziamento dell'intero genoma di *E. faecalis* vancomicina-resistente, ha rivelato un'insospettabile quantità di elementi probabilmente mobili, quasi un quarto dell'intero genoma, ed è proprio la facilità di acquisire ed esportare tali elementi, che contribuisce alla rapida comparsa e disseminazione delle resistenze a cui questa specie sembra più incline (Paulsen 2003).

I fattori di rischio sono quelli comuni che favoriscono l'instaurarsi delle resistenze, a cui si aggiunge la straordinaria persistenza dei VRE nell'ambiente: possono essere isolati anche dopo le usuali pulizie di routine delle superfici o in operatori sanitari, anche se utilizzano le procedure per il contenimento delle trasmissioni (Granlund 2006 Gastmeier 2006); inoltre la loro comparsa sembra essere favorita dall'uso di cefalosporine di terza generazione o piperacillina-tazobactam, che distruggono la flora anaerobia, ma non hanno efficacia contro gli enterococchi; anche la diminuzione dell'acidità nello stomaco con farmaci o per età può essere un fattore di rischio (Donskey 2004 e Donskey 2000).

La colonizzazione intestinale è spesso la manifestazione clinica più comune, ma anche la meno identificata; essa non provoca alcun sintomo, ma se persiste diventa un pericoloso serbatoio di trasmissione e, se la pressione di colonizzazione è elevata, aumenterà la probabilità che possano essere colonizzati anche personale sanitario o i familiari, con il pericolo della diffusione in ambiente comunitario.

È stato dimostrato inoltre che in ambiente ospedaliero pazienti colonizzati da VRE potevano essere colonizzati contemporaneamente anche da *S. aureus* in gran parte MRSA, creando le condizioni per una possibile trasmissione della vancomicina-resistenza a questa specie (Ray 2003, Stiefel 2004).

Il dosaggio e la somministrazione ottimale della vancomicina, che porta a mantenere le concentrazioni sieriche del farmaco costantemente al di sopra della MIC dell'organismo infettivo, si sono dimostrati efficaci nel ridurre l'insorgere delle resistenze (Levine 2006), unico modo per contenere i VRE dato che, in caso di loro presenza, le opzioni terapeutiche sono molto limitate: quinopristin/dalfopristin solo per *E. faecium*; linezolid, daptomicina. Un'alternativa è quella di eliminare i VRE colonizzanti il tratto gastrointestinale: è stata provata una terapia decontaminante con ramoplanina, ma il suo effetto è piuttosto limitato, con ricolonizzazione dopo la conclusione della terapia (Montecalvo 2003).

## 2 SCOPO DELLA RICERCA

Il progetto di ricerca è partito da una prima valutazione sulla situazione locale, con particolare attenzione a microrganismi che presentassero comparsa di antibiotico-resistenza con frequenze che si discostavano in modo significativo dai dati nazionali o internazionali e verso farmaci di recente introduzione.

Analizzando i dati epidemiologici locali, relativi all'anno 2005, si è osservato un dato inconsueto per la relativamente scarsa sensibilità degli enterococchi al linezolid: si è infatti registrata una frequenza di resistenza (erano considerati sia isolati resistenti che a sensibilità intermedia) del 5,5% che non aveva riscontro nei report periodici dei programmi di sorveglianza delle resistenze al linezolid, quali ZAAPS, LEADER, SENTRY, relativi agli anni antecedenti al 2005 (Bolmstrom 2002, Anderegg 2005, Draghi 2005, Jones 2006 e 2007b); anche negli ultimi anni viene riportata una bassissima frequenza di resistenza: nel 2006 un'indagine in 50 ospedali statunitensi riporta il 97,4% di sensibilità in un totale di 547 enterococchi (Jones 2007a). La frequenza di resistenza al linezolid, dalla sua introduzione nell'uso clinico ad oggi, si è sempre mantenuta inferiore al 3% anche in quei paesi, come gli Stati Uniti, dove l'uso indiscriminato degli antibiotici ha portato alla comparsa di resistenze con frequenze superiori all'Europa (Tab 3.1).

	AMERICA Nord % (N)	AMERICA Latina % (N)	ASIA % (N)	EUROPA % (N)	TRIESTE % (N)
<i>S. aureus</i>	100 (1681)	100 (242)	100 (332)	100 (375)	100 (1263)
<i>S. coag.neg</i>	100 (540)	100 (139)	100 (159)	100 (263)	100 (755)
<i>Enterococcus spp.</i>	99,1 (1512)	98,3 (120)	100 (141)	100 (264)	94.5 (1277)

**Tabella 3.1.** Sensibilità al linezolid di alcuni Gram-positivi di più frequente isolamento clinico; i dati internazionali sono ricavati da Ross 2005.

Esistono in letteratura lavori in cui è segnalata una relativamente elevata resistenza al linezolid, che però era imputabile ad una sovrastima determinata dai metodi usati per testare la suscettibilità agli antibiotici, infatti ripetendo i test con metodi alternativi la resistenza non veniva confermata (Brauers 2005); altri lavori, centrati sul paragone fra i sistemi usati normalmente nei laboratori, sia manuali che automatizzati, hanno riportato la difficoltà di rilevazione, con conseguenti false resistenze, e la non concordanza con la presenza della mutazione G2576T di alcuni di questi metodi (Qi 2006, Scheetz 2006, Tenover 2007).

Sempre dalla letteratura si ricavano altri esempi che dimostrano, invece, che MIC nel range intermedio di sensibilità devono essere considerate con attenzione perchè determinate da batteri molto inclini alla resistenza (Swoboda 2005, Bonora 2006b).

I laboratori, con grossi carichi di lavoro, ricorrono sempre più spesso a sistemi automatizzati per l'identificazione e la determinazione di suscettibilità agli antibiotici (AST) degli isolati clinici, ma nonostante i continui aggiornamenti operati dalle ditte produttrici, che portano ad una riduzione degli errori (Abele-Horn 2006), non sempre i risultati riflettono la realtà e ciò vale soprattutto per la sensibilità verso i farmaci introdotti più di recente, dove manca ancora una casistica sufficiente. In caso di risultati dubbi, o di fallimenti terapeutici riscontrati dai clinici, è necessario ricorrere a metodi di controllo, come i test di diffusione in agar, spesso di difficile interpretazione, per la diffusione di una crescita sfumata che non permette la lettura precisa dell'anello di inibizione.

Restano di indiscussa validità i metodi in diluizione e le metodiche di indagine molecolare nel caso di resistenza al linezolid (McGowan 2004).

Nel Laboratorio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti" di Trieste viene utilizzato per la routine il sistema automatizzato Vitek 2 e i controlli delle AST vengono effettuati con i sistemi di diffusione in agar; per la determinazione della sensibilità degli enterococchi non vengono utilizzati test in diluizione; non vengono inoltre utilizzate metodiche molecolari, per il controllo di eventuali resistenze.

Gli obiettivi di questo lavoro sono:

- Seguire nei tre anni, in ceppi di enterococco, le variazioni delle resistenze: ai glicopeptidi, per verificare eventuali modifiche nella frequenza e/o nel fenotipo dei VRE; al linezolid per accertare possibili comparse di isolati resistenti.
- Selezionare i materiali più idonei per la raccolta di isolati enterococcici e definire tecniche di conservazione e protocolli di studio per la rilevazione di resistenze ai glicopeptidi e al linezolid.
- Confermare l'esattezza dei dati ricavati dal sistema automatizzato; in particolare seguire nel tempo la rilevazione di sensibilità intermedie al linezolid e confermare i valori di MIC, refertati dal Vitek, con metodi alternativi.
- Verificare la possibilità di utilizzare un sistema di rilevazione della resistenza al linezolid, basato su tecniche molecolari, semplice e relativamente veloce.

## **3 MATERIALI E METODI**

### ***3.1 Isolamento e conservazione dei ceppi batterici***

Gli Enterococchi, oggetto dello studio, sono stati isolati da tamponi rettali di sorveglianza e da altri materiali nel Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Cattinara, nel periodo compreso fra febbraio 2006 e ottobre 2008. Da colture in agar sangue o altri terreni, secondo il tipo di campione e la conseguente strategia di semina utilizzata nel laboratorio, colonie uguali e ben isolate di enterococchi venivano seminate in 5 ml di brodo Luria Bertani; dopo incubazione overnight a 37°C un'aliquota veniva trattata con DMSO (rapporto brodo-cultura/DMSO 11.3/1) e conservata a -80°C.

### ***3.2 Identificazione e determinazione della sensibilità in vitro agli antibiotici***

#### **3.2.1 Identificazione**

E' stato utilizzato il sistema automatizzato Vitek 2 versione software 4.01 (bioMerieux): card GP, specifica per l'identificazione dei Gram positivi. In breve: il sistema prevede un inoculo a densità 0.5-0.6 McFarland preparato selezionando, da una coltura overnight a 36±2°C in agar, colonie isolate e uguali dell'organismo da identificare. Lo strumento automaticamente aspira sotto vuoto nei pozzetti della card una quantità predefinita (~ 30 µl) di inoculo; la card viene poi sigillata e inserita nello scomparto di incubazione/lettura. L'identificazione avviene in base alla lettura in fluorescenza, ripetuta ogni 15 minuti, di 43 test biochimici, che rilevano l'utilizzo di fonti di carbonio, attività enzimatiche e particolari resistenze; i valori di fluorescenza sono elaborati, secondo algoritmi definiti, in profili biochimici che vengono poi confrontati ai pattern di identificazione dei vari batteri, costruiti in base ai dati rilevati in letteratura e costantemente aggiornati; il software elabora il risultato finale, che verrà espresso anche sotto forma di probabilità percentuale di corrispondenza.

Sono state considerate accettabili probabilità percentuali  $\geq 93\%$ .

## 3.2.2 Determinazione della sensibilità agli antibiotici

### 3.2.2.1 Sistema automatizzato

E' stato utilizzato il sistema Vitek 2 versione software 4.01: card AST-P534, specifica per Enterococchi e *S. agalactiae*. L'inoculo iniziale è lo stesso usato per l'identificazione, che lo strumento automaticamente diluisce (1:11.6) e aspira nei pozzetti della card. I pozzetti contengono 18 antibiotici con un minimo di 3 e un massimo di 6 diluizioni scelte nell'intervallo più rappresentativo per ottimizzare il rapporto tra i dati analitici ed i valori di MIC di riferimento; inoltre viene fornito un dato qualitativo (S o R) per gentamicina, streptomicina e kanamicina ad alto livello. Durante la fase di incubazione, ogni 15 minuti e per ogni pozzetto, viene rilevata la trasmittanza, a 660 nm, e confrontata con quella del pozzetto del controllo positivo. I dati rilevati per ogni antibiotico vengono trasformati con uno speciale algoritmo in un valore di MIC calcolato, che viene poi convertito in categorie S-I-R secondo breakpoints stabiliti da comitati internazionali.

### 3.2.2.2 Test di diffusione in agar

#### 3.2.2.2.1 Diffusione da dischetto

E' stata seguita la tecnica di Kirby-Bauer (Bauer 1966), utilizzando piastre di agar Mueller Hinton (Becton Dickinson GmbH) e dischetti di antibiotici ottenuti da fonti commerciali (Oxoid), secondo le linee guida e i criteri interpretativi suggeriti dal CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007) per *Enterococcus* spp..

#### 3.2.2.2.2 Epsilometer-test (E-test)

Sono state utilizzate le strisce AB Biodisk, contenenti un gradiente esponenziale continuo di concentrazioni di antibiotico sovrapponibili a quelle per la determinazione delle MIC in diluizione; per l'esecuzione e lettura dell'E-test sono state seguite le indicazioni della casa produttrice (terreno Mueller Hinton, inoculo 0,5 McFarland, incubazione a  $36\pm 2^\circ\text{C}$  per 18-24 ore se non indicato diversamente); interpretazione secondo i criteri CLSI adottati per le MIC in diluizione per *Enterococcus* spp.

Come controllo di qualità è stato testato, in ogni sessione di lavoro, il ceppo di riferimento *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **3.2.3 Terreni di screening**

Per il controllo della resistenza alla vancomicina è stato utilizzato il vancomycin screen agar (Becton, Dickinson GmbH), contenente 6 µg/ml di vancomicina.

## **3.3 Estrazione di DNA cromosomico**

### **3.3.1 Estrazione fenolica**

Le cellule batteriche sono state raccolte mediante centrifugazione di 2 ml di una coltura overnight a 37°C in brodo Luria Bertani, lavate in 1 ml di TE<sub>5</sub> pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM), incubate per 1 ora a 37°C nello stesso tampone contenente lisozima 1 mg/ml e lisate in presenza di SDS 0,5% e proteinasi K 250 µg/ml. Il DNA è stato quindi purificato con una estrazione mediante fenolo e tre mediante fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (in rapporto relativo 25:24:1). È stato quindi precipitato aggiungendo alla fase acquosa 0.25 M NaCl e due volumi di etanolo assoluto ed infine risospeso in tampone TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

La qualità dell'estrazione è stata controllata in elettroforesi su gel di agarosio allo 0.8% in TAE 1X (Tris-acetato 0.8 mM pH 8, EDTA 0.04 mM) utilizzando come riferimento quantitativo il DNA del fago λ (GE Healthcare). La corsa veniva condotta nello stesso tampone TAE 1X ad un voltaggio non superiore ai 7.5 V/cm. Il gel veniva poi colorato in TAE 1X contenente etidio bromuro 1 µg/ml per 20-30 minuti, decolorato in acqua e successivamente fotografato.

### **3.3.2 Estrazione rapida a 95°C**

Da una coltura overnight a 37°C in agar Luria Bertani o agar sangue, 2-4 colonie batteriche venivano stemperate in 10 µl di acqua sterile; la sospensione veniva trattata a 95°C per 10 minuti e poi immediatamente usata per le amplificazioni o congelata a -20°C.

## **3.4 Amplificazioni geniche mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Le amplificazioni sono state eseguite nel Thermal Cycler 2700 o 2720 (Applied Biosystem). Alla fine delle reazioni 5 µl di amplificato venivano controllati in gel di agarosio all'1.5% in

TAE 1X utilizzando come standard di peso molecolare 100 Base-Pair Ladder (GE Healthcare), con la procedura descritta al punto 3.3.1

### 3.4.1 Gene codificante rRNA 23S

Per amplificare la regione interna (745 bp) al gene codificante per il rRNA 23S, comprendente il domain V, sono stati usati primers disegnati sulla base della sequenza genica dell'rRNA 23S dell'*Enterococcus faecium* (N. di accesso GenBank X79341, modificati da Bonora 2006b).

Ent23Sfor 5' - TAGTACCTGTGAAGATGCAGG - 3'

Ent23Srev 5' - CACACTTAGATGCTTTCAGCG - 3'

La miscela di reazione era costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM di ciascun desossinucleotide, 0.5 µM di ciascuno dei due primers, 2 U di AmpliTaq Gold (Roche Diagnostics) e circa 100 ng di DNA genomico in un volume finale di 25 µl.

Le condizioni di amplificazione prevedevano una fase di denaturazione iniziale di 4 minuti a 95°C; seguivano poi 30 cicli costituiti da una fase di denaturazione di 30 secondi a 95°C, una fase di appaiamento di 30 secondi a 52°C e una fase di allungamento di 1 minuto a 72°C. Alla fine dei 30 cicli la reazione si concludeva con un'ulteriore fase di allungamento di 5 minuti a 72°C.

### 3.4.2 Gene *vanA*

Per amplificare una porzione del gene *vanA* (732 bp) è stato seguito il metodo di Dukta-Malen con i seguenti primers (Dukta-Malen 1995):

A1 5' - GGGAAAACGACAATTGC - 3'

A2 5' - GTACAATGCGGCCGTTA - 3'

La miscela di reazione era costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM di ciascun desossinucleotide, 0.25 µM di ciascuno dei due primers, 2 U di AmpliTaq Gold (Roche Diagnostics) e circa 100 ng di DNA genomico in un volume finale di 50 µl.

Le condizioni di amplificazione prevedevano una fase di denaturazione iniziale di 10 minuti a 95°C; seguivano 30 cicli costituiti da una fase di denaturazione di 1 minuto a 94°C, una fase di appaiamento di 1 minuto a 58°C e una fase di allungamento di 1 minuto a 72°C. Alla fine dei 30 cicli seguiva un'ulteriore fase di allungamento di 10 minuti a 72°C.



### 3.5 **Analisi di restrizione**

5 µl di amplificato sono stati digeriti con 5 U di enzima *NheI* (NewEngland BioLabs), secondo le indicazioni della ditta fornitrice, in un volume finale di 10 µl; la miscela di digestione veniva incubata a 37°C per un minimo di 2 ore. I prodotti della digestione venivano risolti tramite elettroforesi in gel di agarosio all'1.5% in TAE 1X utilizzando come standard di peso molecolare 100 Base-Pair Ladder (GE Healthcare), con la procedura descritta al punto 2.3.1. Come controllo, sono stati usati i ceppi SM 902, SM 941 e SM 944, rispettivamente sensibile, resistente a basso livello e resistente ad alto livello al linezolid, il cui pattern di restrizione era già stato descritto (Bonora, 2006b).

### 3.6 **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

Per la preparazione dei blocchetti di DNA è stata utilizzata la metodica di Seifert (Seifert 2005): partendo da 1.5 ml di brodocoltura incubata overnight a 37°C i batteri sono stati raccolti per centrifugazione e lavati con 500 µl di acqua distillata sterile; le cellule raccolte sono state risospese in 150 µl di Tris HCl 10 mM + NaCl 1 M a cui sono stati aggiunti 150 µl di Low Melting Agarose (SeaPlaque GTG, BMA) al 2% sciolto in TE pH 8.

Da questa miscela sono stati ricavati blocchetti di 25 µl, fatti solidificare a 4°C. I blocchetti sono stati incubati overnight a 37°C con 3 ml di tampone di lisi (Tris HCl 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 100 mM pH 8, Deossicolato 0,2%, N-laurilsarcosina 0.5%, liozima 5 mg/ml).

Alla fine del periodo di incubazione la miscela di lisi è stata rimossa e sostituita con 1.5 ml di soluzione ESP (EDTA 250 mM pH 8, N-laurilsarcosina 1%, proteinasi K 1 mg/ml); i blocchetti, in questa soluzione, sono stati incubati overnight a 55°C.

Successivamente i campioni sono stati sottoposti a 9 lavaggi di un'ora ciascuno in TE pH 8 sterile, in blanda agitazione a 4°C, e alla fine risospesi nello stesso tampone e conservati a 4°C.

Un blocchetto di ciascuno dei campioni da analizzare è stato poi prelevato dal tampone ed equilibrato in 200 µl di buffer A 1X (Roche Diagnostics GmbH) per 20 minuti, per 2 volte; eliminato il tampone di equilibratura ogni campione è stato risospeso in 300 µl di buffer A 1X contenente 50 U dell'enzima *SmaI* (Roche Diagnostics GmbH) e incubato a 25°C overnight.

Dopo 2 lavaggi, a temperatura ambiente, da 10 minuti ciascuno in 200 µl di tampone TBE 0.5 X pH 8 (Tris-base 45 mM, acido borico 45 mM, EDTA 1 mM) il tampone è stato eliminato, i blocchetti sono stati sciolti a 68°C e caricati nei pozzetti di un gel di agarosio all'1% in TBE 0.5X.

I campioni sono stati fatti migrare, sempre in tampone TBE 0.5X, a 14°C con un voltaggio di 6 V/cm e un angolo di 120° in un apparecchio CHEF DR III (BioRad GenePath System); switch 5-35 secondi e durata della migrazione 22 ore per *E. faecalis*; switch 2-20 secondi e durata della migrazione 19 ore per *E. faecium*. Come standard di riferimento è stato utilizzato il Lambda Ladder PFG marker (NewEngland BioLabs).

Il gel è stato colorato per 45 minuti in una soluzione di etidio bromuro (1 µg/ml in TAE 1X), decolorato in acqua e poi fotografato.

I profili di restrizione sono stati analizzati con il software GelCompar II v. 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), considerando la presenza o assenza di bande con la stessa mobilità. È stato applicato un valore di tolleranza pari a 1.0% (espresso come percentuale della lunghezza totale dei tracciati).

Le percentuali di somiglianza, ottenute con il coefficiente di Dice (Dice 1945), sono state elaborate dal software per produrre un dendrogramma, usando l'algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using mathematical Averaging).

I risultati sono stati interpretati secondo le linee guida suggerite da Tenover (Tenover 1995): isolati geneticamente identici hanno lo stesso numero di bande nei pattern di restrizione e le bande corrispondenti sono della stessa grandezza; isolati strettamente correlati hanno due o tre bande differenti, dovute ad un singolo evento genico come mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni; isolati probabilmente correlati hanno da 4 a 6 bande di differenza, dovute a due eventi genici indipendenti; isolati non geneticamente correlati hanno 7 o più bande differenti, dovute a tre o più eventi genici indipendenti.

## 4 RISULTATI e DISCUSSIONE

### 4.1 Raccolta e caratterizzazione dei ceppi batterici

Lo studio è iniziato con l'isolamento degli enterococchi da campioni provenienti dal Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Cattinara, che raccoglie materiali da sottoporre ad indagini microbiologiche di provenienza ospedaliera e dal territorio; in particolare sono stati considerati i tamponi rettali di sorveglianza, eseguiti regolarmente per il monitoraggio delle resistenze nei reparti ad alto rischio di infezioni (rianimazione e alcuni reparti chirurgici); venivano inoltre conservati enterococchi con resistenza a vancomicina (che avrebbe potuto indurre l'uso del linezolid) o con dubbia sensibilità al linezolid, che erano isolati e identificati direttamente dal Laboratorio in altri materiali.

I **tamponi di sorveglianza** (trs) venivano strisciati su piastre di agar sangue ed enterococcosel agar; dopo incubazione overnight, le colonie venivano esaminate e quelle che per le loro caratteristiche fenotipiche, quali aspetto, grandezza e colore, eventuale tipo di emolisi, positività all'idrolisi dell'esculina (Chuard 1998), potevano essere considerate originate da ceppi di enterococchi, venivano successivamente testate per la sensibilità ad alcuni antibiotici selezionati fra quelli di comune uso in clinica e verso i quali è significativo trovare una resistenza (ampicillina, vancomicina, teicoplanina, quinopristin/dalfopristin, gentamicina ad alto livello e linezolid). Gli isolati sono stati poi conservati a -80°C in modo da costituire una ceppoteca.

Materiale	1 fenotipo	2 fenotipi	>2 fenotipi	Identif.
Tamponi rettali di sorveglianza (85)	59	21	5	2 <i>E. faecium</i> (VRE VanB) 1 <i>E. faecalis</i> 1 <i>E. gallinarum</i> (VRE VanC) 110 <i>Enterococcus species</i>
Urina	1	-	-	<i>E. faecium</i> VanB
Sistemici (bile, sangue, drenaggi)	5	-	-	2 <i>E. faecium</i> (VanB e VanA) 1 <i>E. faecalis</i> 1 <i>E. gallinarum</i> VanC 1 <i>E. avium</i> VanA
Ins. Cat. Ven.	1	-	-	<i>E. faecalis</i> VanA

**Tabella 4.1.** Isolamenti di varie specie di enterococchi dai tamponi rettali di sorveglianza e da materiali vari nel 2006. In base alla sensibilità antibiotica (sensibilità ad ampicillina e resistenza a quinopristin/dalfopristin tipica di *E. faecalis*, inverso per *E. faecium*) gli *E. species* possono essere considerati 73% *E. faecalis*, 11% *E. faecium*, 16% non classificabili.

La Tab. 4.1 riassume i ceppi isolati nel 2006 da 85 tamponi rettali di sorveglianza (114 ceppi) e da materiali diversi, per un totale di 121 isolati batterici.

Dallo stesso campione di sorveglianza si potevano isolare più enterococchi con fenotipi diversi, in base all'aspetto delle colonie e all'antibiogramma; si conferma così la presenza di enterococchi di specie diversa nel tratto gastrointestinale (Martins Teixeira 2003); inoltre in base alla sensibilità all'ampicillina e resistenza al quinopristin/dalfopristin, tipica di *E. faecalis*, il contrario per *E. faecium*, si è potuto stimare, con buona approssimazione, la presenza delle due specie colonizzanti, con la preponderanza di *E. faecalis* nei trs esaminati.

Ampicillina	17
Quinopristin/dalfopristin	77
Gentamicina HL	48
Linezolid	39
Vancomicina	5
Teicoplanina	0

**Tabella 4.2.** Percentuali di resistenza (ceppi I + R) a sei antibiotici, rilevata con il metodo di diffusione in agar (Kirby Bauer), sui 121 ceppi di enterococco isolati nel 2006.

La Tab 4.2 riassume le percentuali di resistenza (sono considerati ceppi a sensibilità intermedia o resistenti) a sei antibiotici dei 121 enterococchi isolati nel 2006; i test di sensibilità sono stati eseguiti con il metodo di diffusione da disco (Kirby Bauer).

E' stato confermato che il test di sensibilità Kirby Bauer non dà risultati precisi: molto spesso attorno all'alone di inibizione del linezolid è stata osservata una crescita sfumata che portava ad un risultato incerto fra sensibilità e resistenza; questo fenomeno avveniva in minore misura anche con altri antibiotici.

Le percentuali di resistenza relative ad ampicillina e quinopristin riflettono in gran misura la resistenza di specie: *E. faecium* è resistente all'ampicillina, *E. faecalis* è resistente al quinopristin/dalfopristin, quindi non sono significative come resistenze acquisite.

Dai dati in letteratura si è visto che la resistenza al linezolid compare solo quando varie copie di geni sono mutate e, qualora non raggiunga livelli elevati, è di difficile interpretazione; il 39% dei ceppi, isolati a Trieste nel 2006, sono tutti risultati a sensibilità intermedia: ciò potrebbe essere dovuto alla difficoltà di interpretare i confini dell'anello di inibizione o a mutazioni che ancora non hanno portato ad un livello di resistenza ben rilevabile.

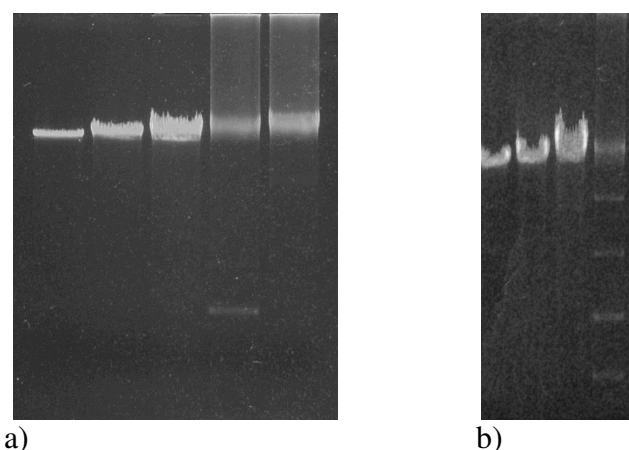
Per cercare di risolvere il problema si è iniziata l'estrazione del DNA cromosomico e la ricerca di metodi per lo studio di eventuali mutazioni.

## 4.2 Valutazione della presenza della mutazione

Per l'estrazione del DNA batterico è stato dapprima utilizzato il metodo classico che prevede l'estrazione con fenolo/fenolo-cloroformio-alcool isoamilico e successiva precipitazione con etanolo.

Questo metodo ha permesso di ricavare discrete quantità di DNA cromosomico (da 1 a >10 µg) da 78 isolati, ma richiede molto tempo (2-3 giorni) e quindi non è adatto per una sua applicazione in un laboratorio clinico, dove la velocità della risposta, soprattutto in caso di sospetta resistenza, è di fondamentale importanza per evitare fallimenti terapeutici.

Questo metodo permette però di poter conservare a +4°C per anni il DNA estratto, che sarà quindi disponibile per ulteriori ricerche.



**Figura 4.1.** Controllo elettroforetico dell'estrazione del DNA cromosomico con fenolo/fenolo-cloroformio-alcool isoamilico. a) e b): lane 1, 2 e 3 standard di riferimento quantitativo derivato dal fago  $\lambda$ , rispettivamente di 50, 100 e 200 ng/µl.; a) lane 4 e 5: DNA estratto da ceppi di enterococco triestini (E 41/06 e E 42/06); b): lane 4 DNA estratto da SM 902.

Tale tipo di estrazione permette anche di evidenziare grossi elementi di DNA extracromosomiale, particolarmente evidenti in E 41/06 e SM 902 (Fig. 4.1).

### 4.2.1 Estrazione di DNA con metodo rapido

Per velocizzare l'estrazione è stato sperimentato un metodo rapido: esso prevede la risospensione in 10 µl di acqua distillata di 2 o più colonie prelevate da una coltura overnight in agar e il trattamento a 95° per 10 minuti.

Il DNA estratto con questo metodo deve essere utilizzato immediatamente, per eventuali amplificazioni, o congelato per evitare una sua degradazione ad opera di enzimi presenti all'origine nei batteri e non completamente neutralizzati dal trattamento al calore.

La quantità di 10 µl permette un unico ciclo di amplificazione, il DNA non sarà quindi disponibile per ripetizioni o ulteriori ricerche; a questo si può ovviare con l'estrazione in 200 µl di acqua distillata, partendo da una quantità di colonie maggiore: i risultati sono sovrapponibili.

Con un notevole risparmio di tempo (pochi minuti contro 2-3 giorni) si ha già a disposizione il DNA da amplificare e sottoporre poi a restrizione, ma, non essendo attuabile un controllo sulla quantità di DNA estratto, sarà possibile verificare il successo dell'estrazione solo dopo l'amplificazione.

L'insuccesso, nell'estrazione con questo metodo, è risultato però molto limitato (7,5% circa), mentre i lati positivi, tempo, materiali minimi e assenza di reattivi tossici, confermano che questa tecnica di estrazione può essere utilizzata anche in laboratori non dotati di particolari attrezzature.

CACTGTCTCA ACGAGAGACT CGGTGAAATT TTAGTACCCTG TGAAGATGCA GGTTACCCGC GACAGGACGG AAGACCCCA  
 ▶▶▶  
 TGGAGCTTA CTGTAGTTG ATATTGAGTG TCTGTACCGC ATGTACAGGA TAGGTAGGAG CCGTAGAAAT CGGAACGGCTA  
 GTTTCGATGG AGGCCGCTGGT GGGATACTAC CCCTGCGTTA TGGCCTACTT AACCCGCACC ACTGATCGTG GTGGGAGACA  
 GTGTCAGATG GGCAGTTTGA CTGGGGCGGT CGCCTCCTAA AAGTAAACGG AGGCGCCCAA AGGTTCCCTC AGAATGGTTG  
 GAAATCATTG GAAGAGTGTA AAGCAGAAAG GGAGCTTGAC TGGGAGACCA ACAAGTCGAG CAGGGACGAA AGTCGGGGCTT  
 AGTGATCCGG TGGTTCCGCA TGGAAGGCC ATCGCTCAAC GGATAAAAGC TACCCTGGGG ATAACAGGCT TATCTCCCCC  
 AAGAGTCCAC ATCGACGGGG AGGTTTGGCA CCTCGATGTC GGCTCGTCGC ATCCTGGGGC TGTAGTCGGT CCCAAGGGTT  
 GGGCTGTTTCG CCCATTAAAG CGGCACCGCAGCTGGTTCA GAACGTCGTG AGACAGTTTCG GTCCCCTATCC GTCGCGGGCG  
 CGGCAC GCTAGCTGGTTCA  
 TTGGAAATTT GAGAGGAGCT GTCCCTTAGTA CGAGAGGACC GGGATGGACT TACCCTGGT GTACCAGTTG TTCTGCCAAG  
 GGCATTGCTG GGTAGCTATG TAGGGAAGGG ATAAAAGCTG AAGCATCTA AGTGTGAAAGC CCACCTCAAG ATGAGATTTT  
 CCATTCTTT AAGAAAGTAA GATCCCTGAG AGATGATCAG GTAGATAGGT CAGGAGTGA AGTACAGTGA TGTATGGAGC  
 GGACTGATAC TAATCGATCG AGGACTTAA

**Figura 4.2.** Sequenza di parte del rDNA 23S (1988→2896 -numerazione in *E. coli*). Evidenziati in verde sono i siti di appaiamento dei primers usati per l'amplificazione, mentre in rosso è evidenziata la base in cui si può manifestare la transversione G2576T che porta alla resistenza al linezolid. Se è presente la mutazione si crea il sito di restrizione per l'enzima *NheI*, evidenziato in azzurro.

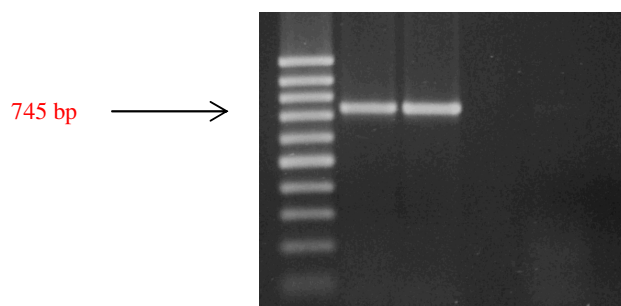
#### 4.2.2 Amplificazione del domain V e analisi in RFLP con *NheI*

La transversion G2576T è praticamente l'unica mutazione nel domain V dell'rRNA 23S rilevabile fra gli isolati clinici, quindi un metodo capace di dedurre la presenza risulterebbe molto utile in caso di sospetta resistenza al linezolid in ceppi di derivazione umana.

Parallelamente ai metodi di estrazione si sono cercate le condizioni ottimali di amplificazione della sequenza di DNA comprendente il sito di mutazione (Fig. 4.2).

Sono stati scelti i primers (ent23S for e rev) e i parametri di amplificazione, leggermente modificati rispetto a quelli ricavati dalla letteratura (Bonora 2006b); l'elettroforesi in gel di agarosio consente di evidenziare la banda di 745 bp, prodotto dell'amplificazione per PCR e corrispondente alla sequenza di DNA al cui interno è presente il sito dell'eventuale mutazione (Fig 4.2).

I primers sono costruiti sul genoma di *E. faecium*, è stato provato che sono applicabili anche per l'amplificazione del rDNA 23S di altre specie di enterococchi: funzionano per *E. faecalis*, *E. avium* e *E. gallinarum*, mentre non amplificano DNA proveniente da altre specie batteriche quali *S. aureus* (Fig 4.3).



**Figura 4.3.** Amplificazione di parte del rDNA 23S da DNA estratto da varie specie batteriche. Lane 1: marker 100 bp ladder (GE Healthcare); lane 2: *Enterococcus faecalis*; lane 3: *Enterococcus avium*; lane 4: bianco reattivi; lane 5: *Staphylococcus aureus*. La presenza della banda di 745 bp è osservata solo per le specie di enterococco.

La presenza della mutazione può essere rilevata con l'utilizzo di opportuni enzimi di restrizione; è stata scelta l'endonucleasi *NheI*: la mutazione G2576T genera un sito unico (Fig 4.2 evidenziato in azzurro), riconosciuto dall'enzima, che procederà al taglio generando due frammenti di 556 e 189 bp, rilevabili elettroforeticamente.

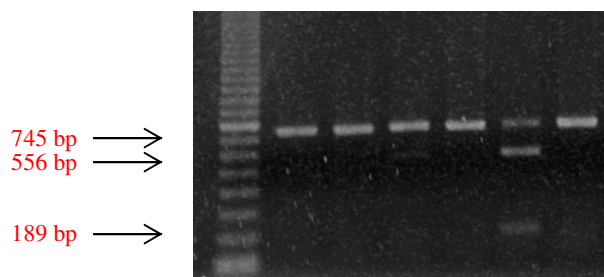
L'elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% in TAE permette di identificare i ceppi mutati e di verificare se la mutazione è avvenuta in tutte le copie di geni che codificano per il domain V dell'rRNA 23S o solo in alcune (Ruggero 2003).

L'acquisizione dei ceppi di controllo SM 902, SM 941 e SM 944, cortesemente forniti dalla Dott.ssa Fontana di Verona, ha reso possibile l'ottimizzazione dei metodi per la verifica della



resistenza; questi ceppi presentano diversi livelli di resistenza al linezolid: MIC di 4 µg/ml, 8 µg/ml e 64 µg/ml rispettivamente (Bonora 2006b), dovuti ad un diverso numero di copie mutate.

In nessuno dei 121 ceppi isolati a Trieste nel 2006 è stata rilevata la mutazione G2576T.



**Figura 4.4.** Digestione con *NheI* degli amplificati di 745 bp ottenuti per PCR a partire da DNA estratto dai campioni di controllo. Lane 1 marker 100 bp ladder (GE Healthcare), le bande di maggiore intensità corrispondono a 100 e 800 bp; lane 2 e 3 amplificato da SM 902, rispettivamente digerito e non digerito; lane 4 e 5 amplificato da SM 941 digerito e non digerito; lane 6 e 7 amplificato da SM 944 digerito e non digerito.

La Fig 4.4 evidenzia che, dopo digestione con *NheI*, il profilo elettroforetico non mostra differenze fra il campione digerito (lane 2) e quello non digerito (lane 3) di SM 902 che non presenta la mutazione G2576T; si nota invece la presenza delle bande a 556 e 189 bp, determinate dalla creazione del sito di taglio per *NheI* all'interno del frammento di 745 bp, nel caso dei campioni digeriti di SM 941 (lane 4) e SM 944 (lane 6).

La permanenza della banda di 745 bp indica che la mutazione non ha coinvolto tutte le copie di geni che codificano per l'rRNA 23S e che SM 944 presenta più copie mutate rispetto a SM 941, dove la banda di 558 bp è appena visibile e la banda non digerita è più intensa.

### 4.3 Correlazione tra analisi RFLP e sensibilità al linezolid

I dati dalla letteratura riportano una correlazione fra la sensibilità al linezolid, espressa come MIC, e il livello di resistenza determinato dalla percentuale delle copie geniche mutate: MIC di 8 µg/ml, ad esempio, sono state rilevate in ceppi che presentano la mutazione in 1 su 6 copie (*E. faecium*); ceppi con MIC di 32 µg/ml presentavano la mutazione in 2-3 su 6 copie; con MIC elevate la mutazione veniva rilevata nella maggioranza delle copie geniche (Marshall 2002).

Per verificare se questa correlazione era manifesta anche nei ceppi di controllo SM 902, SM 941 e SM 944, è stata testata la sensibilità al linezolid con il sistema automatizzato e con due sistemi di diffusione in agar. Il confronto fra i dati rappresentati in Tab 4.3 e i profili di digestione della Fig 4.4 chiaramente dimostra l'esistenza di un legame stretto fra le MIC e l'intensità delle bande originate dalla presenza della mutazione G2576T: SM 944 presenta un

livello di resistenza maggiore (MIC 64 µg/ml) e le bande di 556 bp e 189 bp sono più intense; SM 941 ha un livello di resistenza inferiore (MIC 8 µg/ml) e le rispettive bande sono appena visibili.

È stata inoltre rilevata la difficoltà di individuare la resistenza con i test di sensibilità, sia in automazione, sia con il metodo Kirby Bauer, soprattutto quando solo poche copie di geni sono mutate, come nel caso di SM 941 (Tab. 4.3).

	SM 902	SM 941	SM 944
KB (Ø mm)	S (24)	S? (23-17)	R (6)
Vitek 2 (MIC µg/ml)	S (2)	S (2)	R (≥8)
E-test (MIC µg/ml)*	I (4)	R (8)	R (64)

**Tabella 4.3.** Test di sensibilità al linezolid con tre metodi; R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensibile; sono stati seguiti le linee guida e i criteri interpretativi secondo CLSI per *Enterococcus spp.* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007): MIC (µg/ml): S ≤ 2, I 4, R ≥ 8; disco-diffusione Ø (mm): S ≥ 23, I 21-22, R ≤ 20; \*dati ricavati da Bonora 2006b.

In letteratura vengono riportati vari altri esempi di correlazione fra numero di copie di geni che presentano la caratteristica mutazione e la sensibilità al linezolid espressa come MIC, ma i risultati non sempre sono sovrapponibili, anche in relazione ai metodi usati per determinare le sensibilità e alla variabilità dello stesso metodo fra i laboratori: ceppi che esibiscono una MIC di 4 µg/ml (metodo in agar-diluizione) possedevano già 2 copie mutate di rDNA 23S (Lobritz 2003), in un altro lavoro la stessa MIC (E-test), o addirittura superiore (macrodiluizione in brodo), veniva rilevata in un ceppo dotato di una sola copia mutata (Swoboda 2005, Marshall 2001).

#### **4.4 Isolamento di *Enterococcus faecalis* VanA, resistente a linezolid, in paziente trattato con vancomicina, ma mai con linezolid**

Nel maggio 2007 è stato isolato il primo enterococco resistente ai glicopeptidi e linezolid a Trieste (*E. faecalis* - VLREfs), da un catetere di drenaggio toracico.

Questo ha dato il via ad una serie di prove per la caratterizzazione del ceppo e della sensibilità ai vari antibiotici, per la verifica della presenza della mutazione G2576T e per il controllo dell'eventuale colonizzazione intestinale.

##### **Descrizione del caso clinico.**

Un paziente maschio di 75 anni, diabetico e iperteso, fu ricoverato per dispnea ricorrente tre mesi prima dell'isolamento del ceppo VLREfs; durante la sua lunga permanenza in ospedale

venne trasferito in vari reparti sia medici che chirurgici, con un breve intervallo in rianimazione. Esami radiologici e varie toracocentesi definirono la diagnosi di mesotelioma pleurico. Il paziente aveva riferito esposizione all'asbesto durante gli anni lavorativi.

I primi esami batteriologici nel liquido pleurico risultarono negativi, ma, circa due mesi dopo il ricovero, comparve l'infezione da MRSA e la conseguente diagnosi di empiema pleurico nosocomiale; il paziente venne trattato con vancomicina, fino alla negativizzazione degli esami batteriologici nel liquido pleurico.

Dodici giorni dopo il termine della terapia con vancomicina venne rimosso il catetere di drenaggio toracico e la coltura della punta rivelò la crescita di *E. faecalis* resistente ai glicopeptidi e al linezolid. Data l'assenza di infezione il paziente non ricevette alcuna terapia antibiotica.

Nei mesi successivi non venne evidenziata la presenza di VLREfs nelle colture di sorveglianza; il paziente migliorò e venne dimesso.

#### **Caratterizzazione dei ceppi isolati.**

La sensibilità agli antibiotici, rilevata dal sistema Vitek 2, di *E. faecalis* (E 970) isolato dalla punta del catetere toracico è evidenziata in Tab 4.4.

AMP	P	IPM	E	CIP	LEV	MXF	TE	HLG	LNZ	TEC	VA
S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R
≤ 2	8	≤ 1	2	≥ 8		≥ 8	≥ 16		≥ 32	≥ 32	≥ 32

**Tabella 4.4.** Sensibilità a vari antibiotici di E 970 determinata con il sistema Vitek 2. AMP = Ampicillina, P = Penicillina, IPM = Imipenem, E = Eritromicina, CIP = Ciprofloxacina, LEV = Levofloxacina, MXF = Moxifloxacina, TE = Tetracicline, HLG = Gentamicina ad alto livello, LNZ = Linezolid, TEC = Teicoplanina, VA = Vancomicina. Criteri interpretativi secondo CLSI per *Enterococcus spp.*

La resistenza di E 970 ad entrambi i glicopeptidi, con MIC elevate, è indicativa di un fenotipo VanA. La presenza del gene *vanA* è stata confermata mediante amplificazione del gene con primers specifici.

L'amplificazione del domain V dell'rDNA 23S e successiva digestione con *NheI* ha permesso di evidenziare l'esistenza della tipica mutazione G2576T, mutazione che in questo isolato non coinvolge tutte le copie geniche (Fig 4.5 lane 1).

A questo primo isolamento ha fatto seguito la ricerca di enterococchi resistenti colonizzanti il tratto gastrointestinale, per mezzo della coltura di un tampone rettale di sorveglianza in terreno selettivo per enterococchi (enterococcosel agar – BEA); fu subito chiara la difficoltà di selezionare gli isolati resistenti fra le diverse specie di enterococchi isolati con questo tipo

di procedura: è stato necessario testare varie colonie per differenziare i ceppi sensibili dai resistenti (Tab 4.5 trs 1d), indistinguibili fenotipicamente.

La selezione immediata fu ottenuta invece con l'utilizzo di un nuovo terreno, preparato nel nostro Laboratorio, il Lin-screen che verrà descritto nel capitolo successivo.

La Tab 4.5 riporta i risultati di identificazione e sensibilità agli antibiotici, dei ceppi isolati dai vari materiali provenienti dallo stesso paziente. Dal tampone rettale sono state isolate due specie di enterococchi. Gli isolati di *E. faecalis* includevano sia ceppi resistenti a glicopeptidi e a linezolid, che ceppi sensibili ad entrambi gli antibiotici.

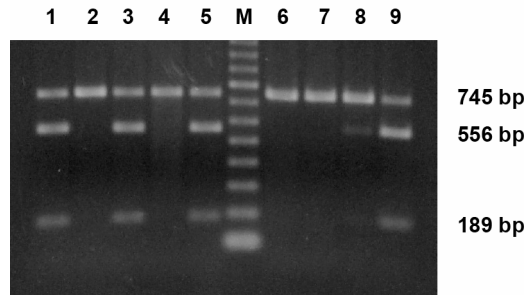
Isolato	Materiale	Identificazione	AST (Vitek) MIC (µg/ml)			KB Ø (mm)	E-test MIC (µg/ml)
			VA	TEC	LNZ	LNZ	LNZ
E 970	Catetere toracico	<i>E. faecalis</i>	R ≥ 32	R ≥ 32	R ≥ 32	R 9	R ≥ 128
E 981	Trs 1 d	<i>E. faecalis</i>	S ≤ 1	S ≤ 0,5	I 4	S 25	S 1,5
E 982	Trs 1 d	<i>E. faecalis</i>	R ≥ 32	R ≥ 32	R ≥ 8	R 18	R ≥ 64
E 984	Trs 1 d	<i>E. casseliflavus</i>	R 8	S ≤ 0,5	S 2	S 26	NT
E 985	Trs 1 ls	<i>E. faecalis</i>	R ≥ 32	R ≥ 32	R ≥ 8	R 6	R ≥ 128
E 986	Trs 1 ls	<i>E. faecalis</i>	S ≤ 1	S ≤ 0,5	S 2	S 25	S 1,5
E 990	Trs 2 ls	<i>E. faecalis</i>	S 2	S ≤ 0,5	S 2	S 23	S 2

**Tabella 4.5.** Sensibilità agli antibiotici (AST) degli enterococchi isolati dallo stesso paziente con la procedura normale (d) o con Lin-screen (ls). R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensibile; NT = non testato. Criteri interpretativi secondo standards CLSI per *Enterococcus spp.*

La resistenza alla vancomicina è stata confermata dalla crescita su vancomycin screen agar e la resistenza al linezolid è stata determinata anche con la tecnica di diffusione in agar da dischetto e con E-test: tutti i VLREfs, indipendentemente dal metodo seguito per il loro isolamento, hanno MICs paragonabili per gli antibiotici testati.

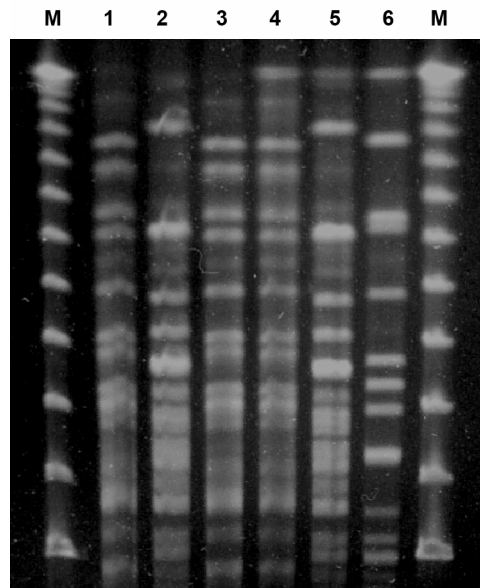
E 990 è stato isolato da un tampone rettale nei mesi successivi, prima delle dimissioni; il campione è stato trattato con la stessa strategia di semina in BEA e successivo Lin-screen; non ha evidenziato presenza di VLRE.

Tutti i ceppi isolati dai tamponi rettali sono stati analizzati per la presenza della mutazione G2576T, che è risultata presente in tutti i VLREfs e che, come in E 970, non coinvolge tutte le copie geniche (Fig. 4.5).



**Figura 4.5.** Digestione con *NheI* degli amplificati di 745 bp ottenuti per PCR a partire da DNA estratto dagli enterococchi isolati dal paziente. Lane 1 – 7: E 970, E 981, E 982, E 984, E 985, E 986, E 990. Lane 8 e 9 controlli positivi SM 941 e SM 944. M: marker 100 bp ladder (GE Healthcare), le bande di maggiore intensità corrispondono a 100 e 800 bp.

Il confronto fra gli isolati, tramite PFGE, ha chiaramente dimostrato l'identità clonale fra il ceppo resistente, isolato dalla punta catetere e quello presente nel tampone rettale: i profili di PFGE sono identici (fig. 4.6: lane 1 e 3 o 4); i ceppi di *E. faecalis* sensibili a vancomicina e linezolid non sono correlati ai resistenti: i loro profili (fig.2: lane 2 o 5, 6) infatti differiscono di oltre sette bande dai profili dei ceppi resistenti.



**Figura 4.6.** PFGE del DNA genomico dei ceppi di *E. faecalis*. Lane 1: E 970 (da catetere toracico), Lane 2 – 6: E 981, E 982, E 985, E 986, E 990 (da tamponi rettali); M: standard di peso molecolare ( $\lambda$  ladder).

Questo, a nostra conoscenza, è il primo caso in Italia documentato di un *E. faecalis vanA* resistente anche a linezolid, in un paziente che non è mai stato trattato con il farmaco, ma che possedeva molti dei fattori di rischio per lo sviluppo della linezolid-resistenza, quali età avanzata, malattie croniche pregresse, lunga ospedalizzazione, precedente infezione da MRSA e procedure invasive (Keiner 2007).

Possibili spiegazioni per la presenza dei VLREfs potrebbero essere o una mutazione casuale o l'acquisizione di un ceppo resistente dall'esterno.

La prima ipotesi è molto improbabile: i ceppi resistenti isolati dal paziente erano correlati fra loro, ma non derivavano dai ceppi sensibili colonizzanti il tratto gastrointestinale, sui quali avrebbe potuto agire la pressione selettiva del farmaco dopo che la mutazione casuale aveva determinato la prima comparsa della transversione G2576T.

Il trasferimento di ceppi resistenti, attraverso operatori sanitari o superfici od oggetti contaminati dal contatto con persone in terapia con linezolid e/o portatori di VRE, è già stato documentato (Duckro 2005, Dobbs 2006); un paziente, trattato per un breve periodo con linezolid per un'infezione da MRSA, era effettivamente presente nello stesso reparto, ma non sono mai stati analizzati i suoi tamponi di sorveglianza, quindi non può essere esclusa, né provata, una sua eventuale colonizzazione e successiva diffusione di VLREfs.

L'ipotesi che la contaminazione crociata sia la principale causa dell'emergenza della linezolid-resistenza è rafforzata dai dati recenti in letteratura, che riportano come solo una minoranza (25%) di pazienti, da cui vengono isolati ceppi resistenti, sia stata sottoposta a terapia con il farmaco, tanto che recentemente il trattamento con linezolid non viene più compreso fra i principali fattori di rischio (Pogue 2007); tuttavia, in esperimenti con topi sottoposti a dieta con e senza linezolid, nessuna mutazione è comparsa in assenza del principio attivo (Bourgeois-Nicolaos 2007).

#### **4.5 Sviluppo del Lin-screen**

Il metodo normale di semina per i tamponi rettali di sorveglianza, utilizzato in Laboratorio, prevedeva lo striscio del tampone su vari terreni agarizzati per la rilevazione di miceti e di batteri Gram-negativi e Gram-positivi. La ricerca di VRE veniva fatta con lo striscio del tampone sul terreno selettivo enterococcosel; dopo incubazione a 36°C le colonie, positive all'idrolisi dell'esculina, venivano prelevate e sottoposte a identificazione e antibiogramma. Con tale procedura eventuali colonie di VRE, presenti in una popolazione mista, venivano selezionate casualmente, e i ceppi resistenti venivano identificati solo se erano molto concentrati.

Successivamente la strategia è stata modificata, per facilitare il rilevamento dei VRE: parecchie colonie positive all'esculina vengono risospese in soluzione fisiologica fino a raggiungere la concentrazione di 1 McFarland; un tampone imbevuto in questa sospensione vien poi strisciato ripetutamente su vancomycin screen agar. Dopo 24 ore di incubazione a

36°C le eventuali colonie cresciute, riferibili a presenza di ceppi resistenti alla vancomicina, vengono sottoposte a identificazione e antibiogramma.

Con tale nuova strategia sarebbe stato facile isolare i VLREfs nei trs del caso precedente; gli enterococchi erano infatti resistenti non solo al linezolid, ma anche alla vancomicina; in quel periodo però non era ancora in uso.

Sono descritti in letteratura isolamenti di enterococchi linezolid-resistenti, ma sensibili alla vancomicina (Dibo 2004, Marra 2006, Seedat 2006): qualora essi fossero presenti, nella microflora intestinale, non potrebbero venire rilevati dal vancomycin screen.

Per facilitare l'isolamento dei ceppi resistenti al linezolid, in campioni ricchi di flora commensale, è stato messo a punto un terreno, che per la facilità di impiego, è molto simile al vancomycin screen agar, potrebbe essere alla portata anche dei laboratori meno attrezzati e potrebbe essere sfruttato dalle case produttrici di terreni pronti all'uso.

Per la preparazione di un terreno di screening contenente linezolid era necessario avere a disposizione la polvere antibiotica o una soluzione a contenuto definito e certo del farmaco. Non essendo reperibile in commercio la polvere, i primi esperimenti sono stati eseguiti con una soluzione di linezolid di circa 100 µg/ml, ottenuta per estrazione in brodo da dischetti da 30 µg di linezolid ciascuno (Oxoid).

Si sono definite successivamente: la concentrazione più idonea di linezolid nel terreno di screening e la densità dell'inoculo.

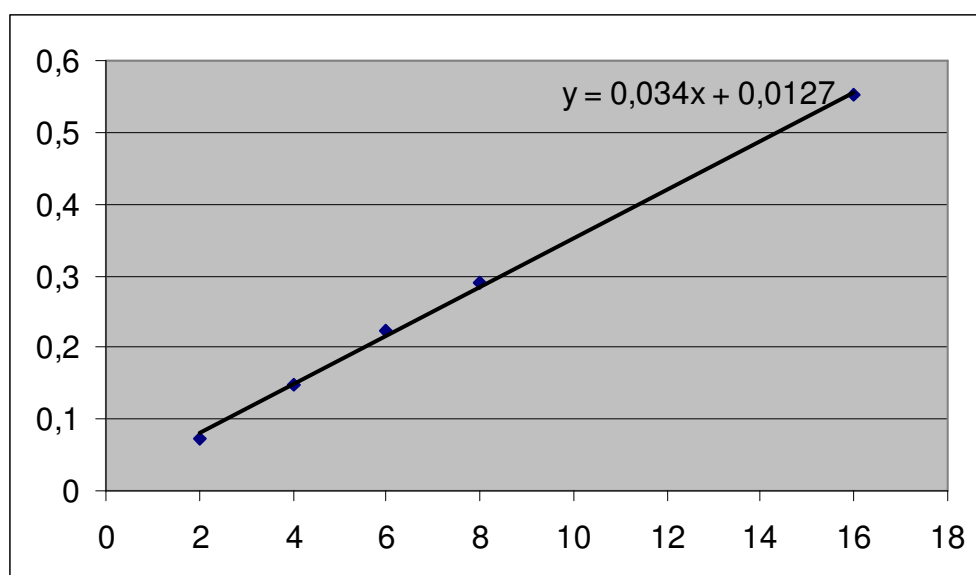
Sono state preparate piastre di agar Müller Hinton con diverse concentrazioni di linezolid (1, 2, 3 e 4 µg/ml), ogni concentrazione è stata saggiata con inoculi, alla densità standard di 0,5 McFarland, di tre ceppi di *E. faecium* sensibili al linezolid e dei due ceppi di *E. faecium* di controllo (SM 941 e SM 944) resistenti al linezolid; è stata scelta la concentrazione di 4 µg/ml in cui non era evidente alcuna crescita dei ceppi sensibili, mentre era ben evidente la crescita dei ceppi resistenti. Tale concentrazione, di poco superiore al limite della sensibilità batterica in vitro, dovrebbe presumibilmente permettere la crescita anche ai ceppi con ridotta sensibilità al linezolid. La densità batterica dell'inoculo doveva essere più elevata possibile per aumentare la probabilità di selezionare i ceppi resistenti, anche se presenti in bassa concentrazione; non doveva essere troppo elevata perchè sarebbe risultato evidente l'inoculo di base, data l'attività batteriostatica del linezolid. Sono state provate, su piastre con 4 µg/ml di linezolid (Lin-screen), sospensioni batteriche a densità diverse (0,5, 1, 2 e 3 McFarland) dei ceppi SM 941 e 944. L'inoculo di base interferiva visivamente solo se la sua densità era  $\geq 3$  McFarland, è stato scelto quindi di usare sospensioni a densità 2 McFarland.

La disponibilità di una sacca per infusione, a concentrazione certificata di 2 mg/ml di linezolid, ha permesso di preparare piastre contenenti esattamente 4 µg/ml di principio attivo e

di confermare che la concentrazione del farmaco nelle piastre usate in precedenza era effettivamente di 4 µg/ml: prove di semina in doppio nelle piastre preparate con le due soluzioni di linezolid, ricavate dalla sacca o dall'estrazione dai dischetti, hanno dato risultati sovrapponibili. I preparati per infusione contengono, oltre al principio attivo, altri eccipienti di nessun effetto verso i batteri; comunque la diluizione finale nelle piastre di Lin-screen è tanto elevata (500 volte), da neutralizzare eventuali sostanze interferenti con la crescita batterica.

La concentrazione della soluzione acquosa di linezolid dei preparati per infusione può essere controllata mediante un semplice metodo di dosaggio spettrofotometrico (Patel 2007), che potrebbe venire utilizzato per quantificare soluzioni del farmaco ottenute in altri modi, ad esempio con l'estrazione da dischetti, fatta però in soluzione fisiologica per eliminare l'interferenza colorimetrica data dal brodo.

La lettura a 258 nm di soluzioni a diverse concentrazioni di linezolid (2, 4, 6, 8 e 16 µg/ml) ha reso possibile definire la curva di taratura e l'equazione lineare rappresentativa della legge di Beer per il linezolid (Fig. 4.7), nelle condizioni operative seguite.

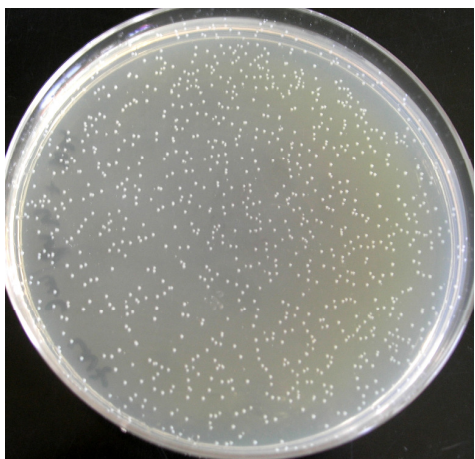


**Figura 4.7.** Linearità della curva di taratura ottenuta per lettura spettrofotometrica a 258 nm di soluzioni di 2, 4, 6, 8 e 16 µg/ml di linezolid

La tecnica finale, basata sull'uso del Lin-screen, prevede i seguenti passaggi: partenza da colonie positive su enterococcosel agar; allestimento di una sospensione batterica a densità 2 McFarland; semina su Lin-screen mediante un tampone imbevuto nella sospensione e strisciato ripetutamente sulla piastra, per ottenere una deposizione costante della sospensione su tutta, o su settori, della piastra di Lin-screen; incubazione a 36-37°C per almeno 48 ore.



Tale tecnica ha permesso l'immediato isolamento e riconoscimento di VLREfs del caso precedente; i ceppi di VLREfs davano origine, su questo terreno, a colonie puntiformi, mentre l'isolamento di *E. faecalis* sensibile al linezolid è stato possibile tramite coltura della zona, di apparente non crescita, circostante alle colonie di VLREfs (Fig. 4.8).



**Figura 4.8.** Crescita di colonie di enterococchi resistenti al linezolid nel terreno Lin-screen (agar Müller Hinton + linezolid 4 µg/ml).

L'utilizzo del Lin-screen ha confermato l'ipotesi che enterococchi resistenti e sensibili al linezolid e alla vancomicina possono coabitare in siti normalmente ricchi di flora commensale; in caso di terapia la specie resistente potrà facilmente prendere il sopravvento, moltiplicandosi, invadendo altri siti organici e diffondendosi ad altri pazienti, se non vengono seguite attente procedure di prevenzione e di controllo.

#### **4.4.1. Limite di rilevazione tramite Lin-screen**

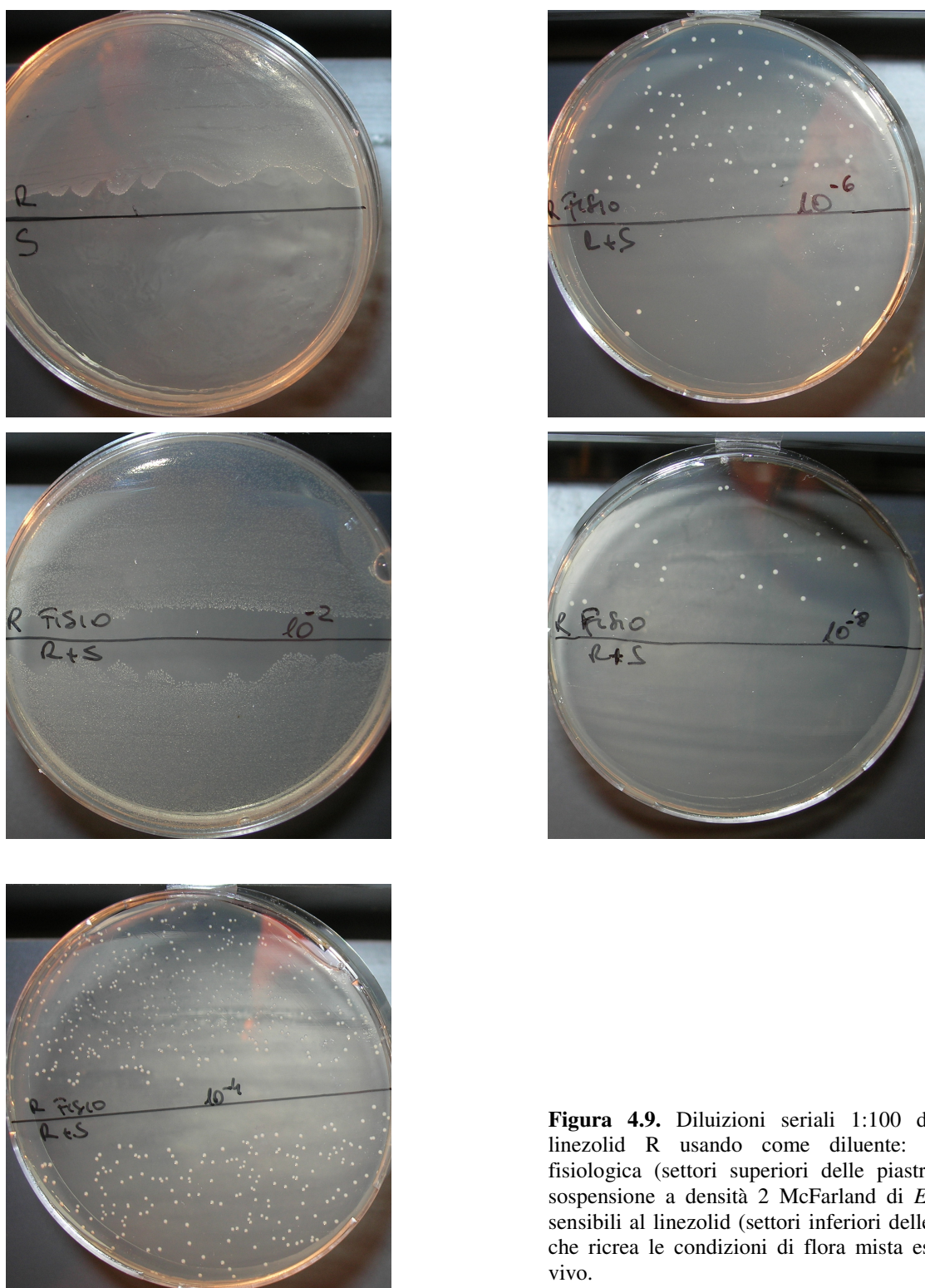
Partendo da una sospensione batterica di VLREfs (E 982) a densità 2 McFarland sono state eseguite diluizioni seriali 1:100: a) in soluzione fisiologica e b) in una sospensione a densità 2 McFarland di *E. faecalis* sensibile al linezolid (E 981); quest'ultima per ricreare in vitro la situazione esistente in vivo e verificare se la specie sensibile potesse in qualche modo influire sulla capacità di crescita del ceppo resistente su Lin-screen.

30 µl, di ogni diluizione del ceppo resistente in fisiologica, sono stati inoculati su mezza piastra di Lin-screen; sull'altra mezza piastra è stata inocolata la stessa quantità delle diluizioni del ceppo resistente nella sospensione del ceppo sensibile.

I risultati, Fig. 4.9, indicano che i ceppi resistenti crescono su Lin-screen sottoforma di patina o di singole colonie in dipendenza della concentrazione. Prove di crescita in terreno senza antibiotico hanno definito che la quantità di batteri nell'inoculo a densità 2 McFarland si aggira fra  $5 \times 10^{10}$ /ml e  $5 \times 10^{11}$ /ml. Il Lin-screen permette di evidenziare crescita di colonie resistenti fino alla diluizione di  $10^{-8}$  in soluzione fisiologica e fino alla diluizione di  $10^{-6}$  nella

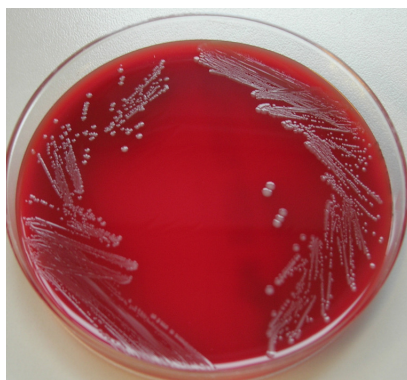
sospensione del ceppo sensibile. Il metodo è dunque molto sensibile riuscendo a rilevare 4 colonie fra un minimo di  $1,5 \times 10^9$  batteri commensali (Fig. 4.9:  $10^{-6}$  R+S).

La concomitante presenza del ceppo sensibile riduce di quasi 100 volte la quantità del ceppo resistente recuperabile con il Lin-screen: ciò potrebbe essere spiegato con una capacità di crescita minore del ceppo resistente, o semplicemente per la diluizione fatta in una sospensione batterica, dove con l'aumentare della diluizione il ceppo resistente diminuisce, mentre il ceppo diluente rimarrà sempre costante.



**Figura 4.9.** Diluizioni seriali 1:100 del ceppo linezolid R usando come diluente: soluzione fisiologica (settori superiori delle piastre) o una sospensione a densità 2 McFarland di *E. faecalis* sensibili al linezolid (settori inferiori delle piastre), che ricrea le condizioni di flora mista esistenti in vivo.

Probabilmente entrambi i fattori entrano in gioco; i ceppi resistenti hanno dimostrato una minore capacità di crescita rispetto ai sensibili in terreni a base di agar-sangue; sulla stessa piastra e nelle stesse condizioni di temperatura e durata di incubazione le colonie del ceppo resistente risultano essere più piccole del rispettivo sensibile (Fig. 4.10).



**Figura 4.10.** Differenza di crescita del ceppo linezolid-resistente (a sinistra) e di quello sensibile, nelle stesse condizioni di temperatura e durata di incubazione.

#### 4.4.2. Il Lin-screen può contribuire alla selezione di mutazioni sporadiche?

La frequenza di mutazione spontanea calcolata in enterococchi e stafilococchi è molto bassa ( $\leq 10^{-10}$  per enterococchi e  $\leq 10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  per stafilococchi) ed è molto difficile selezionare enterococchi resistenti al linezolid in vitro: sono necessari vari passaggi in terreni a concentrazioni crescenti di farmaco per ottenere ceppi con qualche copia di rDNA 23S mutata (Prystowsky 2001).

Il numero di batteri utilizzati per l'inoculo del Lin-screen è tale che esso potrebbe contenere dei mutanti spontanei. Per verificare che un unico passaggio in Lin-screen non selezionasse tali mutanti spontanei, sono stati testati su Lin-screen vari enterococchi, di specie diverse e isolati in vari materiali, sensibili al linezolid (MIC Vitek). I risultati sono riportati in Tab. 4.6.

	N. ceppi	MIC Vitek ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lin-screen
<i>E. faecium</i>	7	2 (S)	Neg.
<i>E. faecalis</i>	6	2 (S)	Neg.
<i>E. species</i>	8	2 (S)	Neg

**Tabella 4.6.** Varie specie di enterococchi sensibili al linezolid e isolati in materiali diversi, non crescono su Lin-screen, la popolazione batterica dell'inoculo non ha subito mutazioni spontanee o, se sono avvenute, non sono di tale entità da essere rilevabili con Lin-screen.

Il campione testato è troppo piccolo per arrivare a conclusioni certe, ma ad una prima analisi dei dati ottenuti non sembrerebbe che il singolo passaggio su Lin-screen sia in grado di selezionare mutanti spontanei. È possibile però che il Lin-screen, contenente 4  $\mu\text{g/ml}$  di linezolid, non consenta la crescita di isolati che, pur possedendo un numero minimo di copie mutate, abbiano una sensibilità ancora nei limiti normali.

Ulteriori studi sono necessari per confermare l'assenza di mutazioni rDNA 23S con tecniche molecolari che permettano, ad esempio, la quantificazione del numero di copie mutate.

#### 4.4.3. Il Lin-screen può promuovere l'estensione delle mutazioni ad ulteriori copie di rDNA 23S?

Per verificare se un singolo passaggio su Lin-screen potesse promuovere l'estensione della mutazione G2576T alle copie wt di rDNA 23S si sono preparate sospensioni batteriche a densità 2 McFarland di tutti i ceppi resistenti al linezolid disponibili; in questi la digestione con *NheI* aveva rilevato mutazioni non estese a tutte le copie di rDNA 23S.

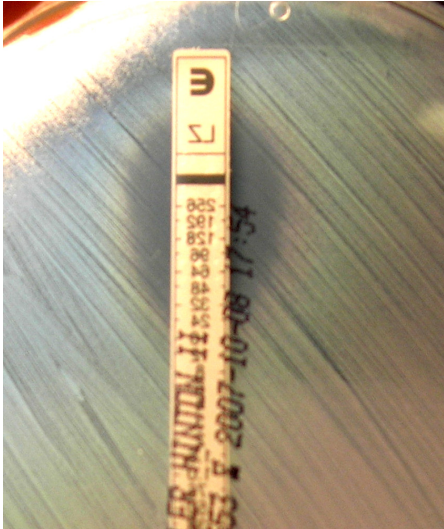
Le sospensioni sono state inoculate, con la tecnica consueta, in parallelo su Lin-screen (LS) e su agar Müller Hinton (MH) senza antibiotico; dopo incubazione a 36°C per 48 ore sono state preparate delle sospensioni a densità 1 McFarland con le crescite su LS e sui corrispondenti MH, per l'esecuzione degli E-test, secondo le linee guida del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007). Le letture degli E-test sono state fatte dopo 24 e 48 ore di incubazione a 36°C. I risultati sono riportati in Tab. 4.7. Nella maggioranza dei casi non si osservano degli aumenti significativi nelle MIC riferite ai ceppi cresciuti su Lin-screen. Quando ciò avviene (SM 944, E 970), la lettura dopo 48 ore neutralizza le differenze.

ID		E-test MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		Lettura dopo 24 (48) h a 36°	
		LS	MH
SM 941	<i>E.faecium</i>	1,5 (2)	1,5 (2)
SM 944	<i>E.faecium</i>	64 (64)	24 (64)
E 970	<i>E.faecalis</i>	24 (64)	16 (64)
E 982	<i>E.faecalis</i>	24 (64)	24 (64)
E 104	<i>E.faecium</i>	4	4
E 106-1	<i>E.faecium</i>	8 (8)	6 (8)
E 106-3	<i>E.faecium</i>	1 (1,5)	1 (2)

**Tabella 4.7.** Influenza della semina su Lin-screen sulla resistenza al linezolid: non si osservano significativi aumenti di MIC, misurate con E-test, sui ceppi cresciuti su LS rispetto agli stessi cresciuti su MH.

La più agevole interpretazione dell'E-test dopo 48 ore a 36°C potrebbe essere spiegata dalla crescita sfumata che tende ad essere meno evidente dopo ulteriore incubazione o dalla crescita più lenta dei microrganismi resistenti. Secondo le istruzioni accluse all'E-test, il valore di MIC viene letto nel punto in cui l'ellisse di inibizione interseca la striscia; i farmaci ad attività batteriostatica non hanno una inibizione netta, ma margini sfumati ed in questo caso si considera l'80-90% di inibizione; è però difficile e soggettivo definire questo 80-90% (Fig. 4.11); la lettura dopo 48 ore viene consigliata anche in letteratura (Arias 2008).





**Figura 4.11.** Esempio di E-test. La lettura è di difficile interpretazione per la presenza di una zona sfumata di crescita nel punto in cui l'ellisse di inibizione interseca la striscia.

Da tutti i risultati sopraesposti si può concludere che il Lin-screen può essere considerato un buon terreno di screening per la resistenza al linezolid:

- a. permette la rilevazione di ceppi resistenti anche se sono presenti in bassa concentrazione in materiali ricchi di flora commensale;
- b. è utilizzabile in laboratori non particolarmente attrezzati;
- c. non sembra selezionare mutanti spontanei, anche se la densità dell'inoculo rientra nell'ordine di grandezza in cui questi possono verificarsi;
- d. non sembra favorire l'estensione della mutazione G2576T in alleli wt;
- e. dovrebbe essere in grado di rilevare ceppi resistenti indipendentemente dal meccanismo di resistenza, se il livello di resistenza rientra nei limiti rilevabili dal Lin-screen.

Ulteriori studi, e la disponibilità di ceppi caratterizzati per resistenza e numero di copie rDNA 23S mutate, sono necessari per valutare il livello minimo di resistenza rilevabile dal Lin-screen.

#### **4.6 Verifica delle sensibilità intermedie rilevate dal Vitek**

Durante il triennio 2006-2008, nel Laboratorio di Microbiologia, si è verificato l'isolamento sporadico di enterococchi con una MIC (Vitek) di 4 µg/ml per il linezolid, MIC che ricade nel range intermedio secondo i criteri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2007).

La sensibilità al linezolid è stata controllata con E-test; i ceppi sono anche stati testati con Lin-screen. I risultati sono riportati in Tab 4.8. Le MIC rilevate con E-test erano nei limiti di sensibilità per tutti i ceppi tranne due, contrassegnati con \* in Tab. 4.8, per i quali è stata effettuata la ricerca della mutazione G2576T con esiti negativi.

La semina su Lin-screen non ha riportato crescita significativa per nessuno dei ceppi testati. Valgono in questo caso le stesse considerazioni fatte per i ceppi sensibili al linezolid, testati su Lin-screen (vedi paragrafo 4.4.2).

	N. ceppi (materiale)	MIC Vitek ( $\mu\text{g/ml}$ )	E-test ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lin-screen
<i>E.faecium</i>	1 (urina)	4 (I)	2 (S)	Neg
<i>E.faecalis</i>	3	4 (I)	1.5 (S)	Neg
	1 (urina)	4 (I)	4 (I)*	Neg
E.spp	3 (3 urina)	4 (I)	2 (S)	Neg
	1 (urina)	4 (I)	3 (I)*	Neg

**Tabella 4.8.** Ceppi di enterococchi a sensibilità intermedia per il linezolid (MIC Vitek): il controllo della sensibilità con E-test non ha rilevato ceppi R, sono stati rilevati due ceppi I (\*). Il Lin-screen non ha riportato crescita.

La maggior parte, 6 su 9, dei ceppi I (Vitek) sono stati isolati da urinocolture, anche in questo caso sono necessarie ulteriori ricerche e un campione più rappresentativo, per escludere la casualità.

#### **4.7 Isolamento di *E. faecium* resistente a vancomicina e linezolid in paziente trattato con linezolid ma non con vancomicina**

L'uso del Lin-screen è stato determinante nell'isolamento di *E. faecium* linezolid-resistenti, colonizzanti, dal secondo caso di linezolid-resistenza verificatosi a fine agosto 2007 a Trieste.

##### **Descrizione del caso clinico.**

Un paziente maschio di 79 anni fu ricoverato, per peritonite secondaria da fistola, dapprima in un reparto chirurgico e poi in rianimazione; gli esami batteriologici eseguiti durante la degenza rilevarono infezioni da Gram-negativi e miceti nei liquidi di drenaggio, sostituiti poi da stafilococchi coagulasi-negativi e *E. faecium* resistente ai glicopeptidi, ma sensibile al linezolid, ceppo che invase l'organismo e venne isolato anche nel sangue. Il paziente venne trattato con linezolid per circa due settimane, fino alla negativizzazione degli esami eseguiti da emocolture; non è stato possibile ottenere i dati su altre terapie, oltre al linezolid, a cui il paziente venne sottoposto, è stato escluso però un suo trattamento con vancomicina o con qualsiasi terapia decontaminante.

Un mese dopo il termine della terapia con linezolid un *E. faecium* resistente ai glicopeptidi, ma ancora sensibile al linezolid venne isolato in un campione di urina. Il paziente venne trasferito in un reparto di Medicina; gli esami batteriologici non evidenziarono più infezioni

sistemiche, ma campioni di feci sottoposti a coltura con il metodo del Lin-screen confermarono la permanenza della colonizzazione con *E. faecium* resistente ai glicopeptidi, diventato però resistente anche a linezolid (VLREfm).

Successivi controlli periodici dimostrarono ancora colonizzazione da VLREfm, per un paio di mesi; tutti i controlli seguenti risultarono negativi e il paziente venne dimesso.

#### Caratterizzazione dei ceppi isolati.

La Tab 4.9 riassume la sensibilità agli antibiotici, rilevata dal sistema Vitek 2, di *E. faecium*: E 99 isolato nel liquido di drenaggio, prima della terapia con linezolid, E 102 isolato in urina ed E 104 isolato nelle feci, dopo il trattamento con linezolid.

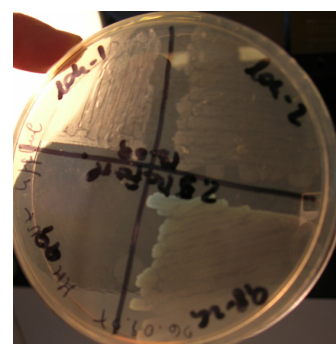
	AMP	P	IPM	E	Q/D	CIP	LEV	MXF	TE	HLG	LNZ	TEC	VA
E 99	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
	≥ 32	≥ 64	≥ 16	≥ 8	1	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≤ 1		2	≥ 32	≥ 32
E 102	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
	≥ 32	≥ 64	≥ 16	≥ 8	1	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≤ 1		2	≥ 32	≥ 32
E 104	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
	≥ 32	≥ 64	≥ 16	≥ 8	1	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≤ 1		2	≥ 32	≥ 32

**Tabella 4.9.** Sensibilità a vari antibiotici determinata con il sistema Vitek 2 dei tre ceppi di *E. faecium* isolati dal paziente prima (E 99) e dopo (E 102 e E 104) terapia con linezolid. AMP = Ampicillina, P = Penicillina, IPM = Imipenem, E = Eritromicina, Q/D = Quinopristin/Dalfopristin, CIP = Ciprofloxacina, LEV = Levofloxacina, MXF = Moxifloxacina, TE = Tetraciclina, HLG = Gentamicina ad alto livello, LNZ = Linezolid, TEC = Teicoplanina, VA = Vancomicina. Criteri interpretativi secondo CLSI per *Enterococcus spp.*

A prima vista i tre isolati sembrerebbero esattamente uguali, ma le prove successive di semina di E 104 su Lin-screen hanno subito messo in evidenza la presenza di *E. faecium* resistenti anche al linezolid (Fig 4.12 a).



a)



b)

**Figura 4.12.** Esempi di crescita su Lin-screen. a) patina che dimostra la presenza e l'elevata concentrazione di LVRE nel campione E 104; b) controllo su Lin-screen dei ceppi isolati prima (E 99) e dopo (E 104) il trattamento con linezolid; 98: ceppo linezolid resistente usato come controllo positivo. Il campione E 104 è stato ripetuto più volte per controllo.



Un controllo successivo su Lin-screen sui ceppi conservati in ceppario, dimostrò l'assenza di resistenza in E 99 ed E 102, mentre confermò la presenza di resistenza in E 104 (Fig 4.12 b). La densa crescita di E 104 su Lin-screen dimostrerebbe l'elevata concentrazione del ceppo resistente nella popolazione colonizzante. La sensibilità al linezolid rilevata dal Vitek (MIC 2 µg/ml) era invece determinata da un basso livello di resistenza, MIC 12 µg/ml rilevata dall'E-test (Tab. 4.10).

Da campioni successivi di feci furono isolati ancora VLREfm. A volte dallo stesso tampone era possibile selezionare su Lin-screen due ceppi VLREfm apparentemente con livelli diversi di resistenza (E 106-1 e E 106-3 in Tab. 4.10 e in Fig. 4.13).

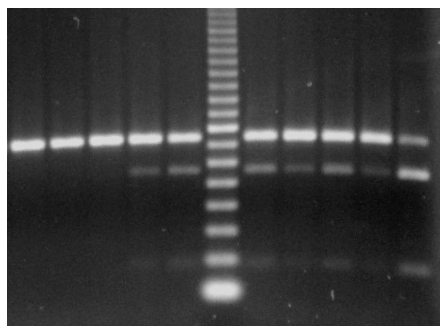
La Tab. 4.10 mette in risalto come le sensibilità determinate con il sistema automatico, non sono sempre correlabili a quelle misurate con E-test; quest'ultimo metodo sembra in questo caso più accurato, registrando MIC nel range di resistenza in presenza della mutazione G2576T (E 104, E 106-1, E 106-3).

Isolato	ID	Materiale	AST Vitek-2			E-test LNZ	G2576T
			VA	TEC	LNZ		
E 99	<i>E. faecium</i>	Liquido dren. add.	R ≥32	R ≥32	S 2	S 1	no
E 100	<i>E. faecium</i>	Trs	NT	NT	NT	S 2	no
E 102	<i>E. faecium</i>	Urina cat. perm.	R ≥32	R ≥32	S 2	NT	no
E 104	<i>E. faecium</i>	Feci	R ≥32	R ≥32	S 2	R 12	si
E 106-1	<i>E. faecium</i>	Feci (Lin-screen colonie)	R ≥32	R ≥32	R ≥8	R 24	si
E 106-2	<i>E. gallinarum</i>	Feci (Lin-screen zona non crescita)	R 16	S ≤0.5	S 1	S 1.5	no
E 106-3	<i>E. faecium</i>	Feci (Lin-screen zona non crescita)	R ≥32	R ≥32	S 2	R 8	si
E 108	<i>E. faecium</i>	Feci (Lin-screen colonie)	NT	NT	NT	R 32	si

**Tabella 4.10.** Sensibilità agli antibiotici (AST) degli enterococchi isolati dallo stesso paziente in materiali diversi. R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensibile; NT = non testato. Criteri interpretativi secondo standards CLSI per *Enterococcus spp.*

La presenza della mutazione G2576T è stata confermata in tutti gli isolati resistenti al linezolid (Fig. 4.13). L'intensità delle bande sembrerebbe correlata alle MIC: E 106-3 con una MIC di 8 µg/ml presenta bande meno intense di E 106-1 che ha una MIC di 24 µg/ml.

Ciò potrebbe essere spiegato con la presenza di una popolazione mista con livelli di resistenza diversi collegabili al numero di copie geniche con la mutazione puntiforme, ulteriori studi sono necessari per confermare questa ipotesi.



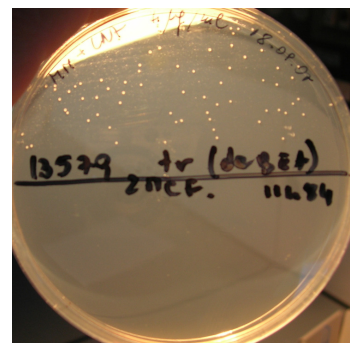
Frammento (bp)	Superficie relativa della banda	
	Isolato 106-1	Isolato 106-3
754	54.4	67.9
556	23.4	18.8
189	22.2	13.3

**Figura 4.13.** Digestione con *NheI* degli amplificati di 745 bp ottenuti per PCR a partire da DNA estratto dagli enterococchi isolati dal paziente. Lane 1 – 5: E 99, E 100, E 102, E 104, E 104-2; lane 7 – 9: E 106-1, E 106-3, E 108. Lane 10 e 11: controlli positivi SM 941 e SM 944; Lane 6: marker 100 bp ladder (GE Healthcare), le bande di maggiore intensità corrispondono a 100 e 800 bp. Nella tabella sono state riportate le superfici relative (esprese come percentuale) delle bande corrispondenti ai frammenti indicati, ottenute dalla lettura densitometrica del gel (GelCompar II v. 4.0 Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Successivi tamponi rettali o campioni di feci trattati con Lin-screen evidenziarono la discontinuità di isolamento dei VLRE: a campioni negativi (25/09 in Tab. 4.11 e Fig. 4.14 settore inferiore), si succedevano campioni positivi (26/09 in Tab. 4.11 e Fig. 4.14 settore superiore); ciò è spiegabile con la concentrazione dei ceppi resistenti colonizzanti nel materiale prelevato, o alle modalità di prelievo: trs o feci; nei trs è presente di solito meno materiale fecale e sarà più difficile isolare ceppi resistenti, se non sono presenti in concentrazioni elevate. Il controllo della colonizzazione non deve quindi fermarsi ai primi risultati negativi.

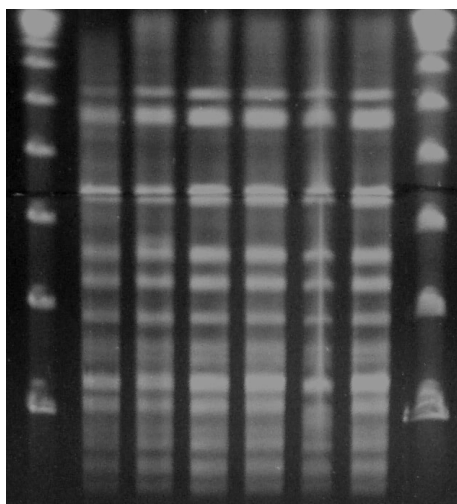
Data Campione	Materiale	Lin-screen
28/06/2007	Trs	Neg
30/08/2007	Trs	Neg
31/08/2007	Feci	++ patina
19/09/2007	Feci	+ colonie
21/09/2007	Feci	Neg
25/09/2007	Feci	Neg
26/09/2007	Feci	+ colonie
05/06/2008	Feci	Neg
16/07/2008	Feci	Neg
11/12/2008	Feci	Neg

**Tabella 4.11.** Controllo su Lin-screen della presenza di VLRE colonizzanti: a campioni negativi possono seguire campioni positivi.



**Figura 4.14.** Controllo su Lin-screen. Settore superiore: positivo per presenza VLRE; settore inferiore: negativo

A differenza del caso precedente, in questo paziente tutti i ceppi di *E. faecium* isolati presentano profili di PFGE con differenze di bande minime, dimostrando l'identità clonale di tutti gli isolati sia resistenti che sensibili al linezolid (Fig. 4.15).



**Figura 4.15.** PFGE del DNA genomico di *E. faecium* isolati dallo stesso paziente prima e dopo terapia con linezolid. Lane 2 – 7: E 99, E 102, E 104, E 106-1, E 106-3, E 108; lane 1 e 8 standard molecolare ( $\lambda$  ladder).

In questo caso la resistenza al linezolid è legata alla terapia, anche se breve, resta però inspiegabile la comparsa di VRE, in assenza di terapia con vancomicina e in assenza di concomitante presenza in reparto di pazienti colonizzati da VRE. I controlli di sorveglianza nei pazienti ricoverati in rianimazione in quel periodo hanno dato esito negativo per VRE; la colonizzazione non può però essere esclusa con certezza: infatti, la sensibilità del metodo per la rilevazione dei VRE su prelievi eseguiti con trs è piuttosto scarsa (D'Agata 2002).

#### **4.8 Correlazione clonale degli *E. faecium* resistenti ai glicopeptidi.**

Durante il triennio 2006-2008 sono stati isolati 39 ceppi di VRE di varie specie e fenotipo di resistenza (Tab 4.12); la specie più rappresentata è *E. faecium*, con un totale di 27 isolamenti; sporadicamente sono stati isolati 4 ceppi invasivi di *E. faecalis*, di cui 3 di fenotipo VanA, fra cui VLREfs del caso descritto; è stato inoltre isolato un ceppo di *E. avium* fenotipo VanA e 5 ceppi di *E. gallinarum* invasivi.

In Tab 4.11 i VRE vengono distinti in base alla sede di isolamento: colonizzanti, se sono stati isolati in trs o materiale fecale; invasivi se l'isolamento è avvenuto in campioni prelevati da siti che normalmente non ospitano come flora commensale le specie batteriche considerate. La definizione di ceppo invasivo, legata solo al sito di prelievo, implica che non sempre il

germe invasivo determina sintomi ascrivibili a malattia, come nel caso dell'isolamento di VLREfs dalla punta del catetere di drenaggio toracico.

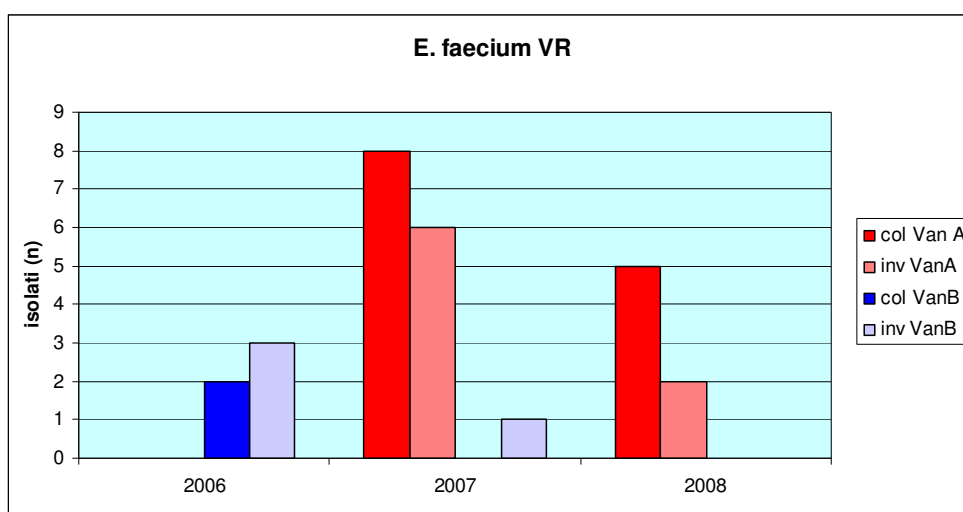
Le percentuali di VRE riportate in Tab. 4.12 non si possono quindi confrontare con quelle nazionali, che sono relative ai soli germi invasivi causa di malattia, ma restano comunque molto al di sotto della media nazionale: 0,6-1,2% contro 11%, dati nazionali riferiti al 2007 solo per *E. faecium* VR (Werner 2008).

L'isolamento di *E. faecalis* di fenotipo VanA, non dovrebbe destare allarme in quanto veramente molto sporadico, ma la sua diffusione deve essere sorvegliata molto attentamente data la pericolosità del ceppo, capace di trasferire i determinanti di resistenza anche ad altre specie batteriche.

	2006 N ( <i>E. faecium</i> )	2007 N ( <i>E. faecium</i> )	2008 N ( <i>E. faecium</i> )
VanA colonizzanti		9 (8)	5 (5)
VanA invasivi	2	7 (6)	3 (2)
VanB colonizzanti	2 (2)		
VanB invasivi	3 (3)	1 (1)	1
VanC invasivi	1	3	2
Enterococchi totali	1143	934	740
% VRE	0,6	1,8	1,2

**Tabella 4.12.** Enterococchi VRE isolati nel triennio 2006-2008. Il fenotipo VanC non è stato incluso nel calcolo della % di VRE annuale.

Il dato rilevante, emerso in questa piccola casistica, è il repentino cambiamento del fenotipo di resistenza di *E. faecium* registrato alla fine del 2006: si osserva infatti il passaggio dal fenotipo VanB, che praticamente scompare, a quello VanA (Fig. 4:16).



**Figura 4.16.** *Enterococcus faecium* vancomicina-resistente: shift dal fenotipo VanB al fenotipo VanA nel triennio 2006-2008

Questo improvviso cambiamento si può solo spiegare con la comparsa nel nostro ospedale di uno dei comuni complessi genetici nosocomiali (fra cui il Complesso Clonale 17, responsabile di episodi epidemici anche in ospedali italiani ed europei), che si stanno diffondendo ovunque nel mondo.

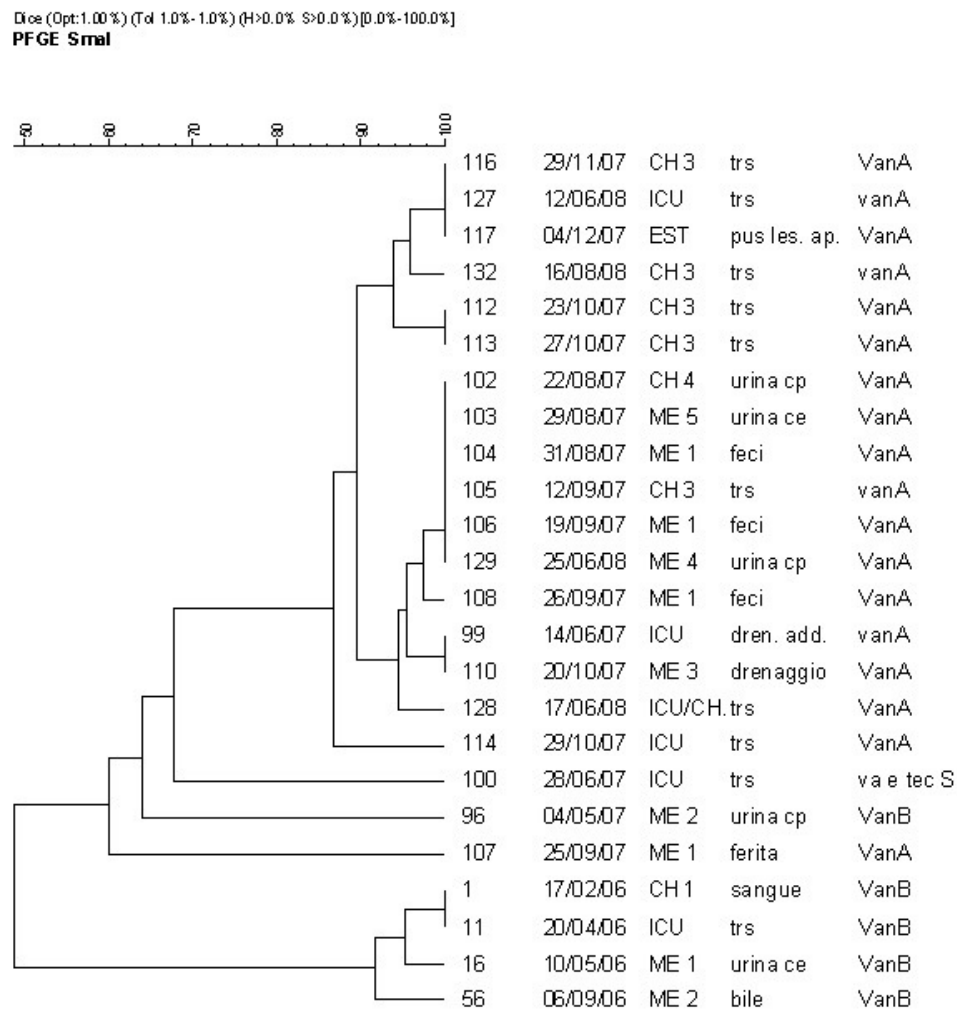
Per capire se gli *E. faecium* VanA fossero geneticamente correlati o diversi è stata eseguita la PFGE dopo macrorestrizione con *Sma*I; i profili di restrizione sono stati elaborati e i risultati sono mostrati nel dendrogramma illustrato in Fig. 4.17.

Nelle colonne a destra del dendrogramma sono indicati: il numero di identificazione dell'isolato; la data del prelievo; il reparto, dove CH è indicativo di uno dei reparti chirurgici, ICU di una rianimazione, ME di uno dei reparti di medicina, EST di provenienza extraospedale; il tipo di materiale; il fenotipo o genotipo, nel caso sia stata verificata la presenza del gene relativo (*vanA*).

I campioni 102, 104, 106, 108, 99 e 100 sono provenienti dallo stesso paziente, il caso descritto precedentemente: rientrano tutti nello stesso gruppo geneticamente simile, tranne il 100 che in realtà è sensibile ai glicopeptidi. Allo stesso gruppo appartengono anche molti altri ceppi, dal 116 al 114, sparsi in tutti i reparti ospedalieri e all'esterno. È rilevante notare che i due campioni 110 e 117 sono stati isolati dalla stessa persona, la prima volta durante il ricovero in ospedale e la seconda dopo le dimissioni. L'infezione, probabilmente acquisita in ospedale, anche se il ricovero è avvenuto in un reparto in cui l'unico isolamento di VanA è relativo a questo caso, è stata quindi portata in comunità, con pericolo per la sua diffusione.

I campioni dal 102 al 128 sono ancora più simili; è fra essi che sono stati selezionati i VLREfm dopo un breve corso di terapia con linezolid.

In esperimenti in vitro di selezione di resistenza al linezolid, attraverso vari passaggi in terreni contenenti concentrazioni di farmaco via via più elevate, è stato visto che ceppi di *E. faecium* vancomicina-resistenti di derivazione clinica si comportavano in modo diverso, alcuni acquisendo la resistenza dopo relativamente pochi passaggi, altri invece dopo molti di più (Prystowsky 2001). È possibile quindi ipotizzare che alcuni ceppi, come i nostri campioni divenuti resistenti dopo un breve trattamento con linezolid, siano più proni alla resistenza al linezolid. Se così fosse un controllo sulla colonizzazione intestinale da VRE dovrebbe essere fatto in qualunque caso prima di iniziare una terapia con linezolid, vista la diffusione generale di questo gruppo.



**Figura 4.17.** Dendrogramma che ricostruisce la correlazione genetica dei ceppi di *E. faecium* vancomicina-resistenti isolati nel triennio 2006-2009. La similarità fra gli isolati (%) è riportata sulla barra in alto a sinistra.

I ceppi VanB (1-56) si aggregano anche in un gruppo geneticamente molto simile, che poi scompare dall'ospedale; l'altro ceppo VanB, che compare nel 2007, non è geneticamente collegato ai primi.

Tutti i ceppi di *E. faecium* VanA isolati presentavano resistenza verso la maggior parte dei farmaci utili, fra cui anche un alto livello di resistenza agli aminoglicosidi, rendendo veramente difficile la scelta terapeutica; il linezolid era spesso l'unica opzione fra i principi attivi testati dal Vitek.

## 5 CONCLUSIONI

Lo studio, partito per valutare la situazione locale delle resistenze a glicopeptidi e linezolid in enterococchi, nel triennio 2006-2008 ha portato a risultati interessanti.

Sono stati isolati e caratterizzati i primi due ceppi di enterococchi resistenti a glicopeptidi e a linezolid: un *E. faecalis*, isolato da una punta di catetere di drenaggio toracico in un paziente che era stato trattato con vancomicina, ma non con linezolid; un *E. faecium*, colonizzante il tratto gastrointestinale di un paziente che in precedenza era stato trattato con un breve ciclo di linezolid, ma mai con vancomicina.

Il primo è di particolare importanza perchè si tratta di un ceppo di *E. faecalis vanA* e resistente anche a linezolid: *E. faecalis* resta il patogeno nosocomiale più comune, ma raramente, in passato, venivano isolati ceppi resistenti alla vancomicina; negli ultimi anni si sta assistendo ad un loro aumento, dovuto principalmente a disseminazione clonale intraospedale, e anche alla preoccupante ascesa dei *vanA*, pericolosissimi per la loro capacità di trasferire i determinanti della resistenza e per un loro ruolo eventuale nella comparsa di VRSA (Oprea 2004, Donabedian 2003); l'acquisizione, per mutazione puntiforme nell' rDNA 23S, della resistenza al linezolid *in vivo*, si manifesta molto raramente in questa specie, anche se *in vitro* è molto più facile selezionare ceppi resistenti di *E. faecalis*, rispetto a *E. faecium*.

Per il secondo caso non si tratta di una particolare novità: sono già riportati in letteratura ceppi di *E. faecium* linezolid R colonizzanti il tratto gastrointestinale, dopo trattamento con linezolid; inoltre il linezolid non ha alcuna efficacia nell'eliminare ceppi enterococcici colonizzanti il tratto gastrointestinale data la sua scarsa eliminazione per via fecale (Moellering 2003).

Preoccupante è la comparsa di due casi di linezolid-resistenza in un breve arco di tempo (circa tre mesi), in un ospedale dove l'uso del linezolid è molto ridotto (DDD 0,1/100-giorno persona) e soprattutto rigorosamente controllato.

I ceppi R possono permanere come "innocui" ospiti colonizzanti per lungo tempo e successivamente provocare infezioni (Mitsogiannis. 2007); la colonizzazione intestinale è spesso la situazione più comune, ma anche la meno identificata; essa non provoca alcun sintomo, ma se persiste diventa un pericoloso serbatoio di trasmissione e, se la pressione di colonizzazione è elevata, aumenterà la probabilità che possano essere colonizzati anche personale sanitario o i parenti con il pericolo della diffusione in ambiente comunitario; inoltre le infezioni enterococciche partono per la maggior parte da ceppi colonizzanti il tratto intestinale (Donskey 2004) e anche la comparsa delle resistenze avviene dapprima fra i ceppi

colonizzanti. Da tutto ciò consegue la necessità di eseguire regolari colture di sorveglianza su tamponi rettali o feci.

Spesso in materiali ricchi di flora commensale, i ceppi resistenti sono un'esigua minoranza difficilmente rilevabile con le normali procedure di isolamento.

La necessità di metodi sensibili di screening, riportata in letteratura (Gonzales 2001, Swoboda 2005) è stata risolta con la messa a punto di un nuovo metodo per lo screening dei ceppi resistenti al linezolid: esso prevede, come per lo screening dei VRE, la semina in un terreno contenente antibiotico, in particolare 4 µg/ml di linezolid.

Questo metodo ha permesso l'isolamento dei due casi descritti di linezolid-resistenza e sembra promettente anche per evidenziare resistenze al linezolid, non dovute alla mutazione G2576T nell'rDNA 23S predominante nei casi clinici, resistenze che iniziano ad essere descritte in letteratura.

È stata confermata la validità delle tecniche molecolari per l'evidenziazione della mutazione, quali l'amplificazione per PCR del frammento genico che codifica per il domain V dell'rRNA 23S, e la sua successiva digestione con l'enzima *NheI*; l'estrazione del DNA cromosomico a caldo permette di avere una risposta già in giornata, con la possibilità di una veloce comunicazione al medico curante in caso di manifesta positività.

I test di sensibilità agli antibiotici, sia automatizzati, che manuali sono talvolta di difficile e dubbia interpretazione, ma il controllo con altri test disponibili in commercio (E-test) aiuta a risolvere il problema.

La frequenza di ceppi di *E. faecium* resistenti alla vancomicina (VRE) nel triennio si è mantenuta entro limiti molto contenuti, ma si è visto un preoccupante aumento dalla fine del 2006 del fenotipo VanA: la tipizzazione di tutti i ceppi VRE isolati, ha dimostrato il concentramento della maggior parte degli isolati in un unico cluster, comprendente anche il ceppo divenuto resistente al linezolid, cluster che è diffuso in tutto l'ospedale e anche in comunità.

L'attenta adesione alle linee-guida per il controllo delle infezioni ospedaliere nel nostro ospedale, linee-guida che comprendono fra l'altro l'immediata comunicazione al Comitato Infezioni Ospedaliere in caso di isolamento di patogeni sentinella, fra cui i VRE, ha evitato l'insorgere di gravi episodi epidemici.

Le resistenze agli antimicrobici esistono da sempre in natura ed è improbabile che scompaiano, i batteri saranno sempre in grado di sviluppare meccanismi di resistenza verso qualsiasi antibiotico, sia naturale che sintetico; il pericolo quindi non è determinato dall'esistenza delle resistenze ma dalla loro propagazione, ne consegue che l'unica speranza



per arginare il fenomeno è di ritardare la trasmissione dei microrganismi resistenti. Una frase (Courvalin 2008) riassume in poche parole le priorità: gli antibiotici devono essere usati con cautela, da personale sanitario ben informato e verso comunità di pazienti altrettanto ben informate.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Abele-Horn M., L. Hommers, R. Trabold, and M. Frosch.** 2006. Validation of Vitek 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* **44**: 71-76.
- Alfonsi V., M. Monaco, F. D'Ancona, M. Ciofi degli Atti, A. Pantosti e il gruppo di lavoro AR-ISS.** 2007. AR-ISS: sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza basato su laboratori sentinella (2003-2005). *Rapporti ISTISAN 07/53*: 28-33
- Ament P. W., N. Jamshed, and J. P. Horne.** 2002. Linezolid: its role in the treatment of Gram-positive, drug-resistant bacterial infections. *Am Fam Physician* **65**: 663-670.
- Anderegg T. R., H. S. Sader, T. R. Fritsche, J. E. Ross, R. N. Jones.** 2005. Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) program. *Int J Antimicrob Agents* **26**: 13-21.
- Andersson D.** 2004. The ways in which bacteria resist antibiotics. The global threat of antibiotic resistance: exploring roads towards concerted action. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation; Uppsala, Sweden. Background document.
- Arias C. E., M. Vallejo, J. Reyes, D. Panesso, J. Moreno, E. Castañeda, M. V. Villegas, B. E. Murray, and J. Quinn.** 2008. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J Clin Microbiol* **46**: 892-896.
- Bauer A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turk.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**: 493-496.
- Benyacoub J., G. L. Czarnecki-Maulden, C. Cavadini, T. Sauthier, R. E. Anderson, E. J. Schiffrin, and T. von der Weid.** 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr* **133**: 1158-1162.
- Besier S., A. Ludwig, J. Zander, V. Brade, and T. A. Wichelhaus.** 2008. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1570-1572.
- Bingen E., R. Leclercq, F. Fitoussi, N. Brahimi, B. Malbruny, D. Deforche, and R. Cohen.** 2002. Emergence of group A streptococcus strain with different mechanisms of macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1199-1203.
- Bolstrom A., C. H. Ballow, A. Qwarnstrom, D. J. Biedenbach, and R. N. Jones.** 2002. Multicentre assessment of linezolid antimicrobial activity and spectrum in Europe: report from the Zyvox<sup>®</sup> antimicrobial potency study (ZAPS-Europe). *Clin Microbiol Infect* **8**:791-800.
- Bonora M. G., M. Ligozzi, A. Luzzani, M. Solbiati, E. Stepan, and R. Fontana.** 2006a. Emergence of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* not dependent on linezolid treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**: 197-198.
- Bonora M. G., M. Solbiati, E. Stepan, A. Zorzi, A. Luzzani, M. R. Catania, and R. Fontana.** 2006b. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol.* **44**: 1153-1155.
- Boo T. W., R. Hone, G. Sheehan, and M. Walsh.** 2003. Isolation of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*. *J Hosp Infect* **53**: 312-313.
- Bourgeois-Nicolaos N., P. Karrat, M. J. Butel, F. Doucet-Populaire.** 2008. Fitness cost of linezolid resistance in *Enterococcus faecalis*. ESCMID 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Barcelona. Abstract O345.

- Bourgeois-Nicolaos N., L. Massias, B. Couson, M. J. Butel, A. Andremont, and F. Doucet-Populaire.** 2007. Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo. *J Infect Dis* **195**: 1480-1488.
- Brauers J., M. Kresken, D. Hafner, P. M. Shah; German Linezolid Resistance Study Group.** 2005. Surveillance of linezolid resistance in Germany, 2001-2002. *Clin Microbiol Infect* **11**:39-46.
- Chaudhary U., M. Shamma, and A. Yadav.** 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual *Enterococcus* species isolated from clinical specimen. *J Infect Dis Antimicrob Agents* **24**: 55-62.
- Chuard C., and L. B. Reller.** 1998. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculations technique, and incubation time. *J Clin Microbiol.* **36**: 1135-1136.
- Clark N. C., L. M. Weigel, J. B. Patel, and F. C. Tenover.** 2005. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 470-472.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17<sup>th</sup> informational supplement. CLSI documents M100-S17. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, Pa.
- Courvalin P.** 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1447-1451.
- Courvalin P.** 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* **42**: S25-S34.
- Courvalin P.** 2008. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* **264**: 4-16.
- D'Agata E. M. C., S. Gautam, W. K. Green, and YW Tang.** 2002. High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* **34**: 167-172.
- Deshpande L. M., T. R. Fritsche, G. J. Moet, D. J. Biedenbach, and R. N. Jones.** 2007. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**: 163-170.
- Dibo I., S. K. Pillai, H. S. Gold, M. R. Baer, M. Wetzler, J. L. Slack, P. A. Hazamy, D. Ball, C. B. Hsiao, P. L. McCarthy Jr, and B. H. Segal.** 2004. Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from a cord blood transplant recipient. *J Clin Microbiol* **42**: 1843-1845.
- Dice L. R.** 1945. Measure of amount of ecological association between species. *Ecology* **26**: 297-302.
- Dobbs T. E., M. Patel, K. B. Waites, S. A. Moser, A. M. Stamm, and C. J. Hoesley.** 2006. Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center. *J Clin Microbiol* **44**: 3368-3370.
- Donabedian S., N. Zaidi, S. Oprea, and M. J. Zervos.** 2003. Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates collected from a Michigan hospital over a 12-year period. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*. William Beaumont Hospital, Royal Oak, MI. abstract no C2-2167.
- Donskey C. J.** 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogen. *Clin Infect Dis* **39**: 219-226.
- Donskey C. J., T. K. Chowdhry, M. T. Hecker, C. K. Hoyen, J. A. Hanrahan, A. M. Hujer, R. A. Hutton-Thomas, C. C. Whalen, R. A. Bonomo, and L. B. Rice.** 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* **343**: 1925-1932.

- Draghi D. C., D. J. Sheehan, P. Hogan, and D.F. Sahn.** 2005. In vitro activity of linezolid against key Gram-positive organisms isolated in the United States: Results of the LEADER 2004 Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 5024-5032.
- Drago L., L. Nicola, and E. De Vecchi.** 2008. A comparative in-vitro evaluation of resistance selection after exposure to teicoplanin, vancomycin, linezolid and quinopristin-dalfopristin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus spp.* *Clin Microbiol Infect* **14**: 608-611.
- Dresser L. D., and M. J. Rybak.** 1998. The pharmacologic and bacteriologic properties of oxazolidinones, a new class of synthetic antimicrobials. *Pharmacotherapy* **18**: 456-462.
- Drlica K. and X. Zhao.** 2007. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis* **44**: 681-688.
- Duckro A. N., D. W. Blom, E. A. Lyle, R. A. Weinstein, and M. K. Hayden.** 2005. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med* **165**: 302-307.
- Dutka-Malen S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 24-27.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System.** 2006. EARSS Annual report 2005. <http://www.rivm.nl/earss>
- EMA European Medicines Agency.** 2008. Withdrawal assessment report for Tygacil. <http://www.emea.europa.eu>
- Furno P., G. Bucaneve, A. Del Favero.** 2002a. Nuovi farmaci antibatterici (1<sup>a</sup> parte). *Informazioni sui Farmaci* **4**; <http://informazioneisuifarmaci.it>
- Furno P., G. Bucaneve, A. Del Favero.** 2002b. Nuovi farmaci antibatterici (2<sup>a</sup> parte). *Informazioni sui Farmaci* **5**; <http://informazioneisuifarmaci.it>
- Gastmeier P., F. Schwab, S. Bärwolff, H. Rüden, H. Grundmann.** 2006. Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J Hosp Infect* **62**: 181-186.
- Gillespie S. H.** 2001. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Int J Antimicrob Agents* **17**: 171-176.
- Gilmore M. S., and J. J. Ferretti.** 2003. The thin line between gut commensal and pathogen. *Science* **299**: 1999-2002.
- Gonzales R. D., P. C. Schreckenberger, M. B. Graham, S. Kelkar, K. DenBesten, and J. P. Quinn.** 2001. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* **357**: 1179-1179.
- Granlund M., C. Carlsson, H. Edebro, K. Emanuelsson, R. Lundholm.** 2006. Nosocomial outbreak of *vanB2* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sweden. *J Hosp Infect* **62**: 254-256.
- Hancock R. E. W.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* **5**: 209-218.
- Hashimoto J. G., B. S. Stevenson, and T. M. Schmidt.** 2003. Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *J Bacteriol* **185**: 966-972.
- Heymann D. L.** 2006. Resistance to anti-infective drugs and the threat to public health. *Cell* **124**: 671-675.
- Informazioni sui farmaci.** 2007a. Telitromicina. Rischio di tossicità epatica. <http://www.informazioneisuifarmaci.it> farmacovigilanza – telitromicina agg. 09/2007.
- Informazioni sui farmaci.** 2007b. Tigeciclina. Uso ospedaliero. <http://www.informazioneisuifarmaci.it> agg. 08/2007.

- Jensen L. B., A. M. Hammerum, R. L. Poulsen, and H. Westh.** 1999. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 724-725.
- Jones M. E., D. C. Draghi, C. Thornsberry, J. A. Karlowsky, D. F. Sahn, and R. P. Wenzel.** 2004. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **3**: 14-25.
- Jones R., T. Fritsche, H. Sader, J. Ross.** 2007a. LEADER surveillance program results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from the United States (50 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**: 309-317.
- Jones R. N., J. E. Ross, T. R. Fritsche and H. S. Sader.** 2006. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox® annual appraisal of potency and spectrum (ZAAPS) program assessing isolates from 16 nations. *J Antimicrob Chemother* **57**: 279-287.
- Jones R. N., M. G. Stilwell, P. A. Hogan, and D. J. Sheehan.** 2007b. Activity of linezolid against 3,251 strains of uncommonly isolated Gram-positive organisms: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 1491-1493.
- Kaatz G. W., and S. M. Seo.** 1996. In vitro activities of oxazolidinone compound U100592 and U100766 against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 799-801.
- Keiner M. A., R. A. Devasia, T. F. Jones, B. P. Simmons, K. Melton, S. Chow, J. Broyles, K. L. Moore, A. S. Craig, and W. Schaffner.** 2007. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* **13**: 1024-1030.
- Kelly S., J. Collins, M. Davin, C. Gowing, and P. G. Murphy.** 2006. Linezolid resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* **58**: 898-899.
- Klajn R.** 2005. Linezolid. Molecule of the month. <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/motm.htm>.
- Klappenbach J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole, and T. M. Schmidt.** 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res* **29**: 181-184.
- Kloss P., L. Xiong, D. L. Shinabarger, and A. S. Mankin.** 1999. Resistance mutation in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* **294**: 93-101.
- Kugelberg E., S. Löfmark, B. Wretling, and D. L. Andersson.** 2005. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **55**: 22-30.
- Leach K. L., S. M. Swaney, J. R. Colca, W. G. McDonald, J. R. Blinn, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, D. Shinabarger, L. Xiong, and A. S. Mankin.** 2007. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell* **26**: 393-407.
- Levine D. P.** 2006. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis* **42**: S5-S12.
- Livermore D. M.** 2003. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother* **51**, Suppl. S2: ii9-ii16.
- Lobritz M., R. Hutton-Thomas, S. Marshall, and L. B. Rice.** 2003. Recombination proficiency influences frequency and locus of mutational resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3318-3320.
- Manfredi R.** 2006. Update on the appropriate use of linezolid in clinical practice. *Ther Clin Risk Manag* **2**: 455-464.
- Marra A. R., Y. Major, and M. B. Edmond.** 2006. Central venous catheter colonization by linezolid-resistant, vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* **44**: 1915-1916.

- Marshall S. H., C. J. Donskey, R. Hutton-Thomas, R. A. Salata, and L. B. Rice. 2002. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3334-3336.
- Martinez J. L., A. Fajardo, L. Garmendia, A. Hernandez, J. F. Linares, L. Martinez-Solano, and M. B. Sanchez. 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 44-65.
- Martins Teixeira L., and R. R. Facklam. 2003. Enterococcus. p. 422-433. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology (8<sup>th</sup> edition)*. ASM Press, Washington, D.C.
- McGowan J. E. Jr, and F. C. Tenover. 2004. Confronting bacterial resistance in healthcare settings: a crucial role for microbiologists. *Nat Rev Microbiol* **2**: 251-258
- Meka V. G., H. S. Gold, A. Cooke, L. Venkataraman, G. M. Eliopoulos, R. C. Jr Moellering, and S. G. Jenkins. 2004a. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **54**: 818-820.
- Meka V. G., S. K. Pillai, G. Sakoulas, C. Wennersten, L. Venkataraman, P. C. DeGirolami, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering Jr., and H. S. Gold. 2004b. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* **190**: 311-317.
- Milstone A. M., J. Dick, B. Carson, G. K. Siberry. 2007. Cerebrospinal fluid penetration and bacteriostatic activity of linezolid against *Enterococcus faecalis* in a child with a ventriculoperitoneal shunt infection. *Pediatr Neurosurg* **43**: 406-409.
- Mitsogiannis I. C., A. Oeconomou, M. Karanika, E. Petinaki, and M. D. Melekos. 2007. Colonization by a linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* caused a urinary tract infection. *Scand J Infect Dis* **39**: 649-650.
- Moellering R. C. Jr. 2003. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med* **138**: 135-142.
- Montecalvo M. A.. 2003. Ramoplanin: a novel antimicrobial agent with the potential to prevent vancomycin-resistant enterococcal infection in high-risk patients. *J Antimicrob Chemother* **51** (S3): iii31-iii35.
- Nicoletti G., G. Bonfiglio, A. Bartoloni, R. Mattina, P. Nicoletti, P. Pecile, R. Rescaldani, M. A. Romeo, G. Russo, O. Savarino, S. Stefani, and F. Paradisi. 2000. Distribution and antibiotic resistance of isolates from lower respiratory tract and blood cultures from patients in three Italian intensive care units: a 2-year comparison. *Int J Antimicrob Agents* **15**: 265-269.
- Noskin G. A., V. Stosor, I. Cooper, L. R. Peterson. 1995. Recovery of vancomycin resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* **16**: 577-581.
- Oprea S. F., N. Zaidi, S. M. Donabedian, M. Balasubramaniam, E. Hershberger, and M. J. Zervos. 2004. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* **53**: 626-630.
- Ostrowsky B. E., W. E Trick, A. H. Sohn, S. B. Quirk, S. Holt, L. A. Carson, B. C. Hill, M. J. Arduino, M. J. Kuehnert, and W. R. Jarvis. 2001. Control of vancomycin-resistant *Enterococcus* in health care facilities in a region. *N Engl J Med* **344**: 1427-1433.
- Patel S. A., P. U. Patel, N. J. Patel, M. M. Patel, and U. V. Bangoriya. 2007. Determination of linezolid in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectroscopy. *J AOAC Int* **90**: 1272-1277.
- Paulsen I. T., L. Banerjee, G. S. A. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, et al. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**: 2071-2074.
- Pillai S.K., G. Sakoulas, C. Wennersten, G. M. Eliopoulos, R. C. Jr. Moellering, M. J. Ferraro, and H. S. Gold. 2002. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis* **186**: 1603-1607.

- Prammananan T., P. Sander, B. Springer, and E. C. Böttger.** 1999. RecA-mediated gene conversion and aminoglycoside resistance in strains heterozygous for rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 447-453.
- Prystowsky J., F. Siddiqui, J. Chosay D. L. Shinabarger, J. Millichap, L. R. Peterson, and G. A. Noskin.** 2001. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2154-2156.
- Pogue J. M., D. L. Paterson, A. W. Pasculle, and B. A. Potoski.** 2007. Determination of risk factors associated with isolation of linezolid-resistant strains of vancomycin-resistant enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**: 1382-1388.
- Qi C., X. Zheng, A. Obias, M. H. Scheetz, M. Malczynski, and J. R. Warren.** 2006. Comparison of testing methods for detection of decreased linezolid susceptibility due to G2576T mutation of the 23S rRNA gene in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* **44**: 1098-1100.
- Rice L. B., D. F. Sahn, and R. A. Bonomo.** 2003. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. p. 1074-1101. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (8<sup>th</sup> edition). ASM Press, Washington, D.C.
- Rahim S., S. K. Pillai, H. S. Gold, L. Venkataraman, K. Ingle, and R. A. Press.** 2003. Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patient without prior exposure to linezolid. *Clin Infect Dis* **36**: E146-E148.
- Ray A. J., N. J. Pultz, A. Bhalla, D. C. Aron, and C. J. Donskey.** 2003. Coexistence of vancomycin-resistant *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients. *Clin Infect Dis* **37**: 875-881.
- Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Agenzia Regionale della Sanità.** 2007. Il registro delle resistenze agli antibiotici della regione Friuli Venezia Giulia: strumento al servizio di una terapia antibiotica appropriata e del controllo delle infezioni ospedaliere. Dati del triennio 2004-2006. <http://www.sanita.fvg.it/ars/welcome.htm>
- Reynolds P. E., and P. Courvalin.** 2005. Vancomycin resistance in Enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 21-25.
- Ross J. E., T. R. Fritsche, H. S. Sader, R. N. Jones.** 2005. Linezolid susceptibility testing results in Europe: report from the worldwide ZAAPS program (2003). 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Copenhagen. Abstract P1864.
- Ruggero K.A., L. K. Schroeder, P. C. Schreckenberger, A. S. Mankin, and J.P. Quinn.** 2003. Nosocomial superinfection due to linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*: evidence for a gene dosage effect on linezolid MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**: 511-513.
- Sander P., B. Springer, T. Prammananan, A. Sturmfels, M. Kappler, M. Pletschette, and E. C. Böttger.** 2002. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1204-1211.
- Scheetz M. H., C. Qi, G. A. Noskin, J. R. Warren, M. J. Postelnick, M. Malczynski, J. Huang, and T. R. Zembower.** 2006. The clinical impact of linezolid susceptibility reporting in patients with vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* **56**: 407-413.
- Scheetz M. H., S. Knechtel, M. Malczynski, M. J. Postelnick, and C. Qi.** 2008. Increasing incidence of linezolid-intermediate or -resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains parallels increasing linezolid consumption. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2256-2259.
- Schito G. C.** 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **12**:3-8.
- Seedat J., G. Zick, I. Klare, C. Konstabel, N. Weiler, and H. Sahly.** 2006. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 4217-4219.

- Seifert, H., L. Dolzani, R. Bressan, T. van der Reijden, B. van Strijen, D. Stefanik, H. Heersma, and L. Dijkshoorn. 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **43**:4328-4335.
- Siegel J. D., E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2006. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 74 p.: <http://www.premierinc.com/safety/topics/guidelines/downloads/mdro-guideline-2006.doc>
- Slee A. M., M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory, and M. Forbes. 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 1791-1797.
- Spratt B. G. 1996. Antibiotic resistance: counting the cost. *Curr Biol* **6**: 1219-1221.
- Spratt A., and J. Wade. 2005. Emerging resistance in hospital-acquired infection. *The Biomedical Scientist* Aug 2005:825-831. [http://www.ibms.org/pdf/bs\\_articles\\_2005/emerging\\_resistance\\_infection.pdf](http://www.ibms.org/pdf/bs_articles_2005/emerging_resistance_infection.pdf)
- Stiefel U., and C. J Donskey. 2004. The role of the intestinal tract as a source for transmission of nosocomial pathogens. *Curr Infect Dis Rep* **6**: 420-425.
- Swaney S. M., H. Aoki, M. C. Ganoza, and D. L. Shinabarger. 1998a. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 3251-3255.
- Swaney S. M., D. L. Shinabarger., R. D. Schaadt, J. H. Bock, J. L. Slightom, and G. E. Zurenko. 1998b. Oxazolidinone resistance is associated with a mutation in the peptidyl transferase region of 23S rRNA. 38<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego. Abstract C-104.
- Swenson J. M., J. Fick Hindler, and J. H Jorgensen. 2003. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. p. 1178-1181. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology (8<sup>th</sup> edition)*. ASM Press, Washington, D.C.
- Swoboda S., S. Fritz, M. E. Martignoni, R. A. Feldhues, T. Hoppe-Tichy, M. W. Buchler, and H. K. Geiss. 2005. Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report. *J Antimicrob Chemother* **56**: 787-789.
- Talbot T. R. 2007. Two studies feed the debate on active surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci carriage: to screen or not to screen? *J Infect Dis* **195**: 314-317.
- Tenover F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-2239.
- Tenover F. C., P. P. Williams, S. Stocker, A. Thompson, L. A. Clark, B. Limbago, R. B. Carey, S. M. Poppe, D. Shinabarger, and J. E. McGowan Jr. 2007. Accuracy of six antimicrobial susceptibility methods for testing linezolid against staphylococci and enterococci. *J Clin Microbiol* **45**: 2917-2922.
- Toh S. M., L. Xiong, C. A. Arias, M. V. Villegas, K. Lolans, J. Quinn, and A. S. Mankin. 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol* **64**: 1506-1514.
- Torres C., S. Escobar, A. Portillo, L. Torres, A. Rezusta, F. Ruiz-Larrea, M. J. Revillo, C. Aspiroz, and M. Zarazaga. 2006. Detection of clonally related *vanB2*-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. *J Med Microbiol* **55**: 1237-1243.
- Tsioupras S., H. S. Gold, G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R. C. Moellering, and M. J. Ferraro. 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**: 207-208.



- Werner G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe et al.. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* **13**: 1-11. [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)
- Werner G., B. Strommenger, I. Klare, and W. Witte. 2004. Molecular detection of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* by use of 5' nuclease real-time PCR compared to a modified classical approach. *J Clin Microbiol* **42**: 5327-5331.
- Willems R. J., J. Top, D. J. Smith, D. I. Roper, S. E. North, and N. Woodford. 2003. Mutations in the DNA mismatch repair proteins MutS and MutL of oxazolidinone-resistant or -susceptible *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3061-3066.
- Wolter N., A. M. Smith, D. J. Farrell, and K. P. Klugman. 2006. Heterogeneous macrolide resistance and gene conversion in the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 359-361.
- Wolter N., A. M. Smith, D. J. Farrell, W. Schaffner, M. Moore, C. G. Whitney, J. H. Jorgensen, and K. P. Klugman. 2005. Novel mechanisms of resistance to oxazolidinones, macrolides and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3554-3557.
- Woodford N., L. Tysall, C. Auckland, M. W. Stockdale, A. J. Lawson, R. A. Walker, and D. M. Livermore. 2002. Detection of oxazolidinone-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains by Real-Time PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* **40**: 4298-4300.
- Wootton M., A. P. MacGowan, T. R. Walsh, and R. A. Howe. 2007. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* **45**: 329-332.
- Yagi Y., and D. B. Clewell. 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* **143**: 966-970.
- Zurenko G. E., B. H. Yagi, R. D. Schaadt, J. W. Allison, J. O. Kilburn, S. E. Glickman et al. 1996. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 839-845.
- Zyvoxid:  
[http://www.agenziafarmaco.it/ATTUALITA/sectionba1e.html?target=&area\\_tematica=ATTUALITA&section\\_code=AIFA\\_ATTUALITA&entity\\_id=111.101587.1173374127033](http://www.agenziafarmaco.it/ATTUALITA/sectionba1e.html?target=&area_tematica=ATTUALITA&section_code=AIFA_ATTUALITA&entity_id=111.101587.1173374127033)
- Zyvox  
[http://media.pfizer.com/files/products/uspi\\_zyvox.pdf](http://media.pfizer.com/files/products/uspi_zyvox.pdf)  
[http://www.pfizer.com/products/rx/rx\\_product\\_zyvox.jsp](http://www.pfizer.com/products/rx/rx_product_zyvox.jsp)