



XLVI Congresso Nazionale AMCLI

11 - 14 Novembre 2017

Palacongressi di Rimini

Epidemiologia e ruolo clinico di MRSA: un quadro in continua evoluzione

Rimini 11-14 Novembre 2017



S. Campana, D. Dolce
Centro Fibrosi Cistica AOU Meyer Firenze



Staphylococcus aureus e la farmaco-resistenza...

1940

Penicillinase, an enzyme capable of destroying penicillin, identified in bacteria

1942

First therapeutic use of penicillin

1943

Penicillin mass-produced

1945

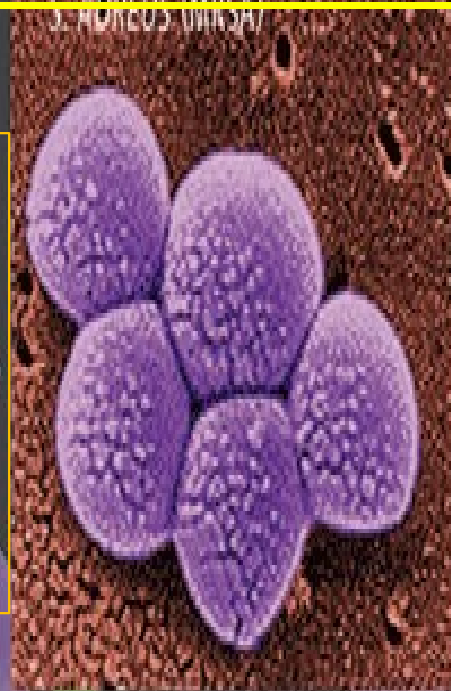
More than 20% of *S. aureus* hospital isolates are penicillin-resistant as penicillinase begins to spread worldwide

1947

Streptomycin approved by FDA

1947

Streptomycin resistance observed

**1952**

Tetracycline approved by FDA

1956

Tetracycline resistance observed

1958

Vancomycin introduced, although rarely used until the mid-1980s

1959

Methicillin introduced

1961

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) observed

1964

Cephalothin, first antibiotic in the cephalosporin class, introduced

1966

Cephalothin resistance observed

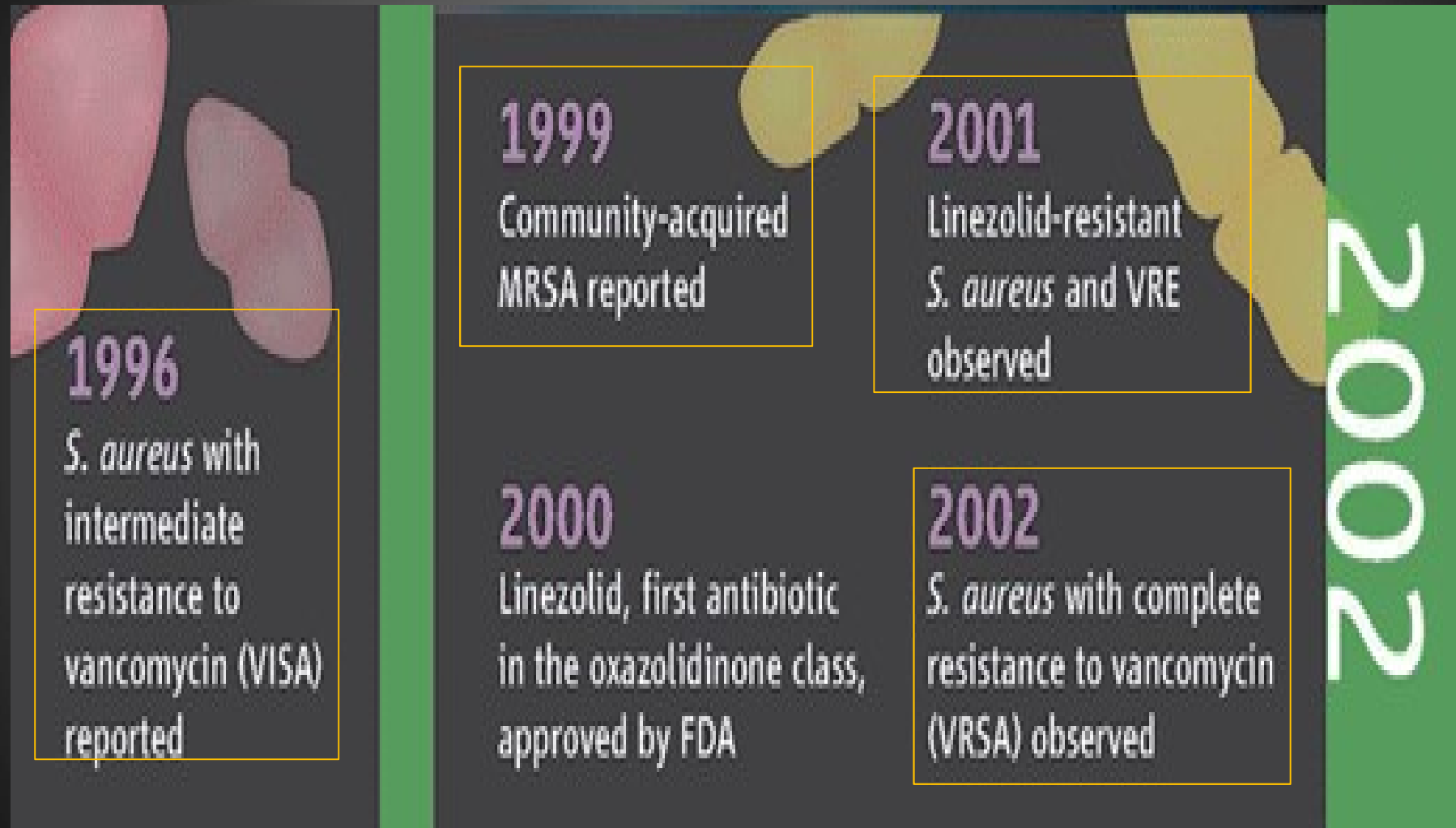
1967

Gentamicin approved by FDA

1970

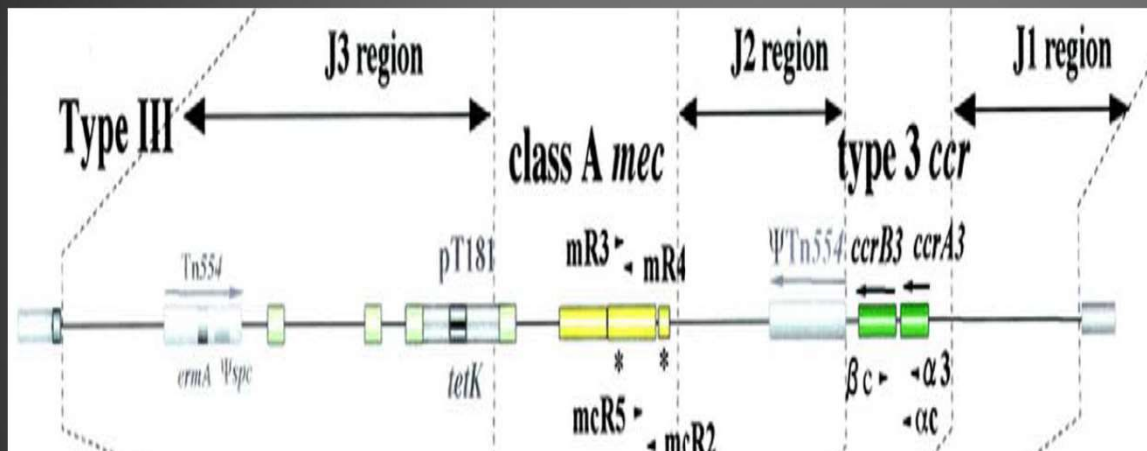
Gentamicin resistance observed

Staphylococcus aureus e la farmaco resistenza...



La base genetica della resistenza di MRSA

I ceppi di MRSA sono caratterizzati dalla presenza di una cassetta genetica “SSCmec cassette” responsabile della resistenza.



SCC_{mec} types

HA-MRSA CA-MRSA

I	IV
II	V
III	

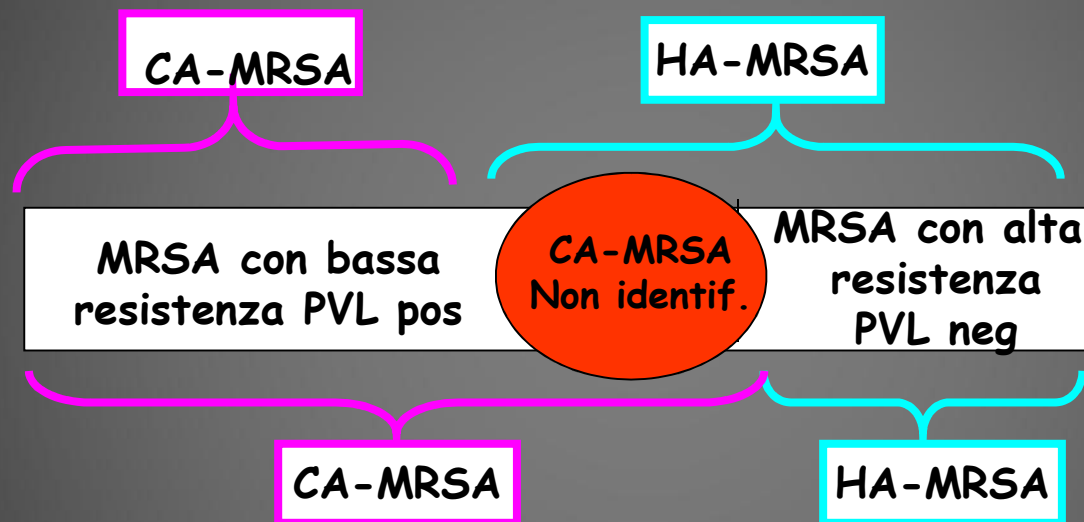
STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME *mec* (SCC*mec*)

- **Esistono 8 diversi tipi di SCCmec, in base ai quali si distinguono CA-MRSA e HA-MRSA**

MRSA di acquisizione comunitaria o ospedaliera?

CRITERI CLINICI (CDC):

l'identificazione di CA-MRSA si basa sulla mancata esposizione a fattori di rischio legati all'ambiente ospedaliero



CRITERI MOLECOLARI:

tipizzazione della cassetta SCCmec

Confronto fra HA-MRSA and CA-MRSA

	<u>HA-MRSA</u>	<u>CA-MRSA</u>
Tipo di SCCmec	I, II, and III	IV and V
clone	USA 100	USA300, USA400, USA500
PVL	rara	comune
Profilo di chemiosensibilità	Molto resistenti	Sensibili ai non β -lattamici
tossine	Tipiche tossine di MRSA	18 tossine addizionali
Quadro Clinico	Quadri clinici classici	Infezioni dei tessuti molli (comuni), fascite necrotizzante (rara)
trasmissibilità	Contatto diretto con persone e/o ambiente contaminati	Contatto diretto con persone e/o ambiente contaminati

MRSA: un quadro in evoluzione continua...



MRSA sono isolati con frequenza crescente in USA, Asia, Europa

Aires de Souza *et al.* J Clin Microbiol. 2005

MRSA sono noti come patogeni ospedalieri (HA-MRSA) sono isolati con frequenza crescente a livello comunitario (CA-MRSA)

Lancet Infect Dis 2005

CA-MRSA sono più virulenti e stanno rimpiazzando HA-MRSA a livello ospedaliero

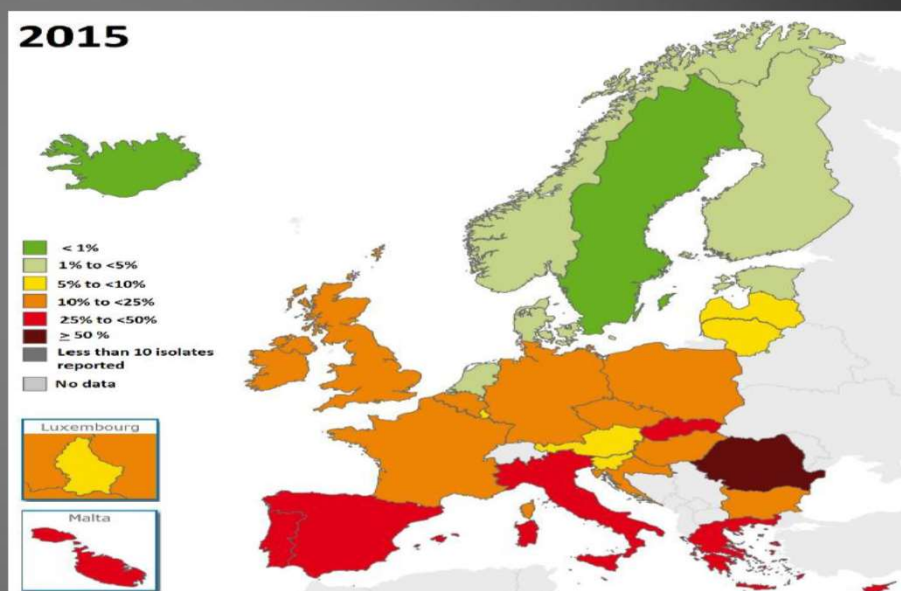
Popovich *et al.* Clin Infect Dis 2008

CA-MRSA possono produrre una tossina citotossica (Panton-Valentine) causa di polmoniti necrotizzanti

Boyle-Vavra *et al.* Lab Investig. 2007

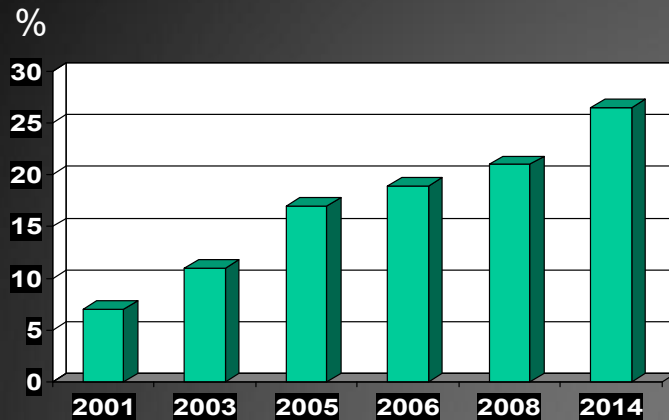
MRSA è isolato con frequenza crescente anche da pazienti FC

NACF Registry (2014)

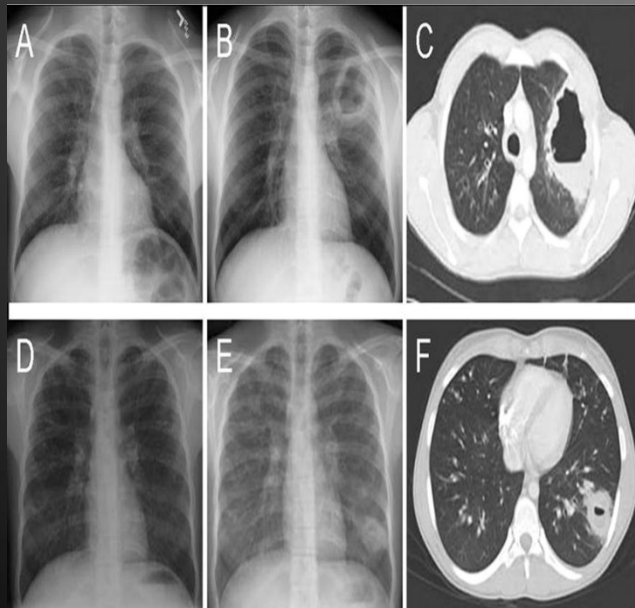


Prevalenza di infezioni invasive da MRSA in FC (EARSS 2015)

MRSA sono isolati con frequenza crescente anche in FC



Prevalenza di MRSA in FC
(USA CF Patient Registry)



•CA-MRSA stanno infettando anche i pazienti FC

Taccetti G *et al* Lancet 2010

-Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis.

Elizur A *et al* Chest 2007

-Transmission of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* between patients with cystic fibrosis.

Elizur A *et al* J Pediatr 2007

-Complex molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with cystic fibrosis in the era of epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Glikman D *et al* Chest 2008

Staphylococcus aureus e la resistenza ai glicopeptidi

- *I glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina)* per decenni hanno rappresentato il trattamento d'elezione per il trattamento delle infezioni da MRSA
- Isolati di MRSA con MIC $\geq 1.5\mu\text{g/ml}$ per teicoplanina e vancomicina sono associati ad una più alta percentuale di fallimenti terapeutici e mortalità. *Van Hal SJ et al Clin Infet Dis 2012*
- Recentemente è stata documentato un aumento della distribuzioni delle MIC della vancomicina , teicoplanina e linezolid verso valori più alti (anche se nel range della sensibilità). *Hsieh et al Medicine 2016.*

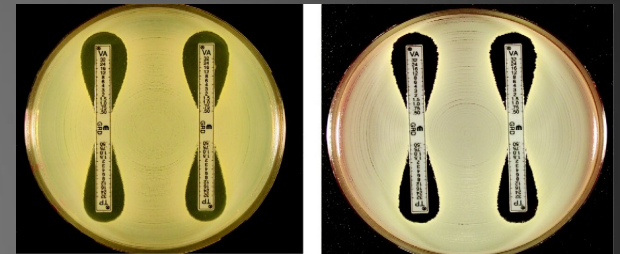
Staphylococcus aureus e la resistenza ai farmaci glicopeptidici in FC

- Prima descrizione di MRSA/GISA in un paziente FC con esacerbazione polmonare trattata con vancomicina

Denis *et al* J Antimicrob Chemother 2002

- 8 MRSA/GISA (3.4% dei pazienti con *S. aureus*)

Dumitrescu *et al* 2009



- Tre ceppi di hVISA (eteroresistenza con sensibilità intermedia a vancomicina) con isolati nella popolazione FC afferente al centro di Catania

Cafiso V *et al* Eur Clin Microbiol Infect Dis (2010)

- Gisa/hGISA da 5 pazienti FC (4.7% dei pazienti colonizzati da *S. aureus*)

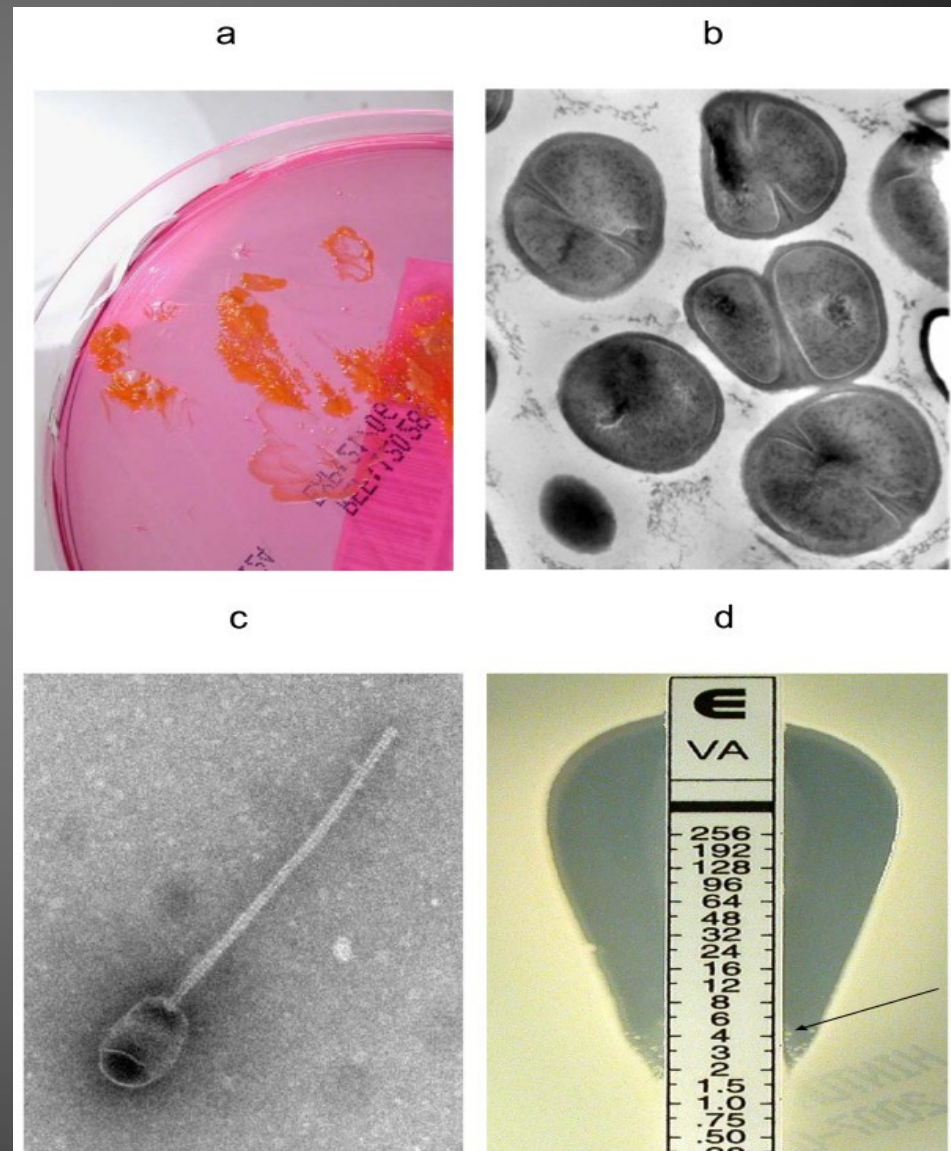
Filleron *et al* JCF 2011

- PREVALENZA IN AUMENTO ANCHE SE SOTTOSTIMATA

Staphylococcus aureus e la resistenza ai farmaci glicopeptidici in FC

-Un ceppo di MRSA con sensibilità intermedia alla vancomicina si è diffuso in 80 pazienti FC in Francia

Rolain *et al* Biology Direct 2009



Resistenza al linezolid

Per gli isolati clinici MIC ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$

Principali meccanismi

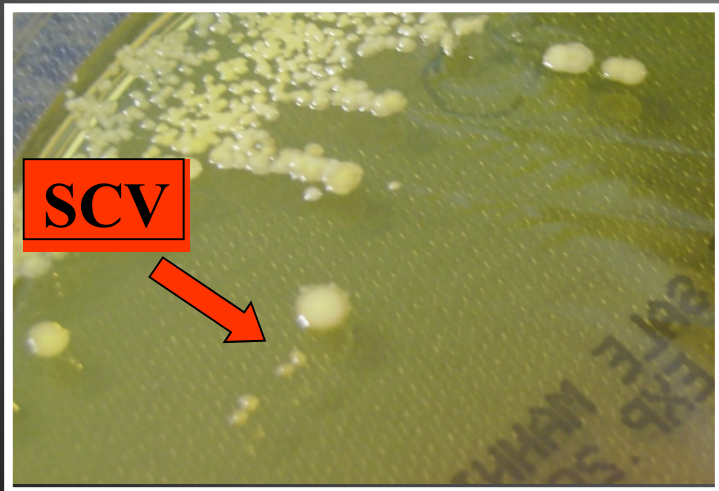
- Alterazione nell'unità 23S rRNA
- Mutazioni nelle proteine ribosomiali
- Resistenza plasmidica dovuta al gene *cfr*

Resistenza al linezolid in FC

- La resistenza al linezolid nei pazienti FC è stata documentata ed è prevalentemente dovuta a mutazioni ribosomiali
- Isolamento da 4 pazienti FC di ceppi di MRSA resistenti al linezolid. La resistenza è dovuta alla presenza del gene *cfr*. Questi ceppi appartengono allo stesso clone (ST125-SCC*mecIV*) Caballero *et al* Antimicrob Agents Chemother 2016
- Nel nostro centro abbiamo isolato (periodo 2013-2015) 8 ceppi di *S. aureus* resistenti al linezolid di questi 2 sono MRSA. Un paziente è colonizzato persistentemente da MRSA linezolid resistente.

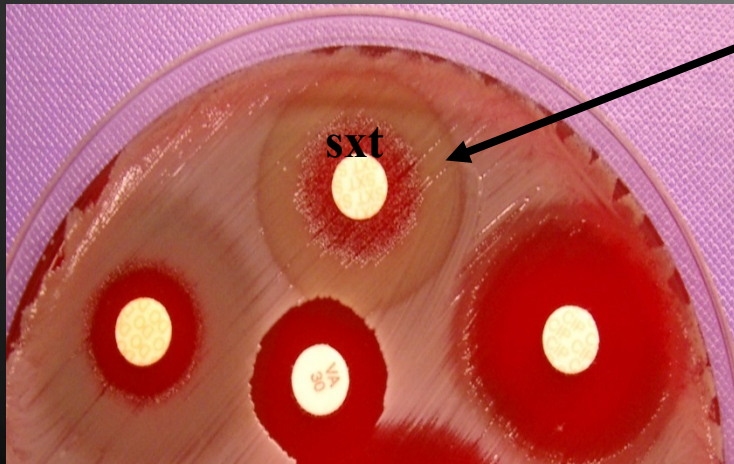
Varianti di *S. aureus* a colonia piccola (SCV)

- Isolati da un ampio spettro di infezioni
- (batteremia, sinusiti, osteomieliti, artrite settica)
- Sono responsabili di infezioni persistenti e non responsive ai trattamenti farmacologici
- Mutanti che non sono in grado più di produrre per particolari sostanze necessarie per la crescita (auxotrofi) per emina, timidina, menadione, presenza di CO₂
- La loro crescita dipende dal fatto che nel terreno vi siano le sostanze che non sono più in grado di sintetizzare



Varianti a colonia piccola di (SCV)

- Isolamento delle varianti a colonia piccola (SCV) crescita lenta, non sempre sono visibili dopo 48 ore di incubazione ma necessitano di tempi di crescita più lunghi (72 ore)
- I test di agglutinazione al lattice richiedono tempi più lunghi
- E' molto importante cercare di isolare queste varianti di *S. aureus* in quanto spesso sono caratterizzate da un'alta resistenza agli antibiotici.
- Prevalenza in FC varia dal 4 al 33%. [Khal et al Clin Microbiol Rev 2016](#)



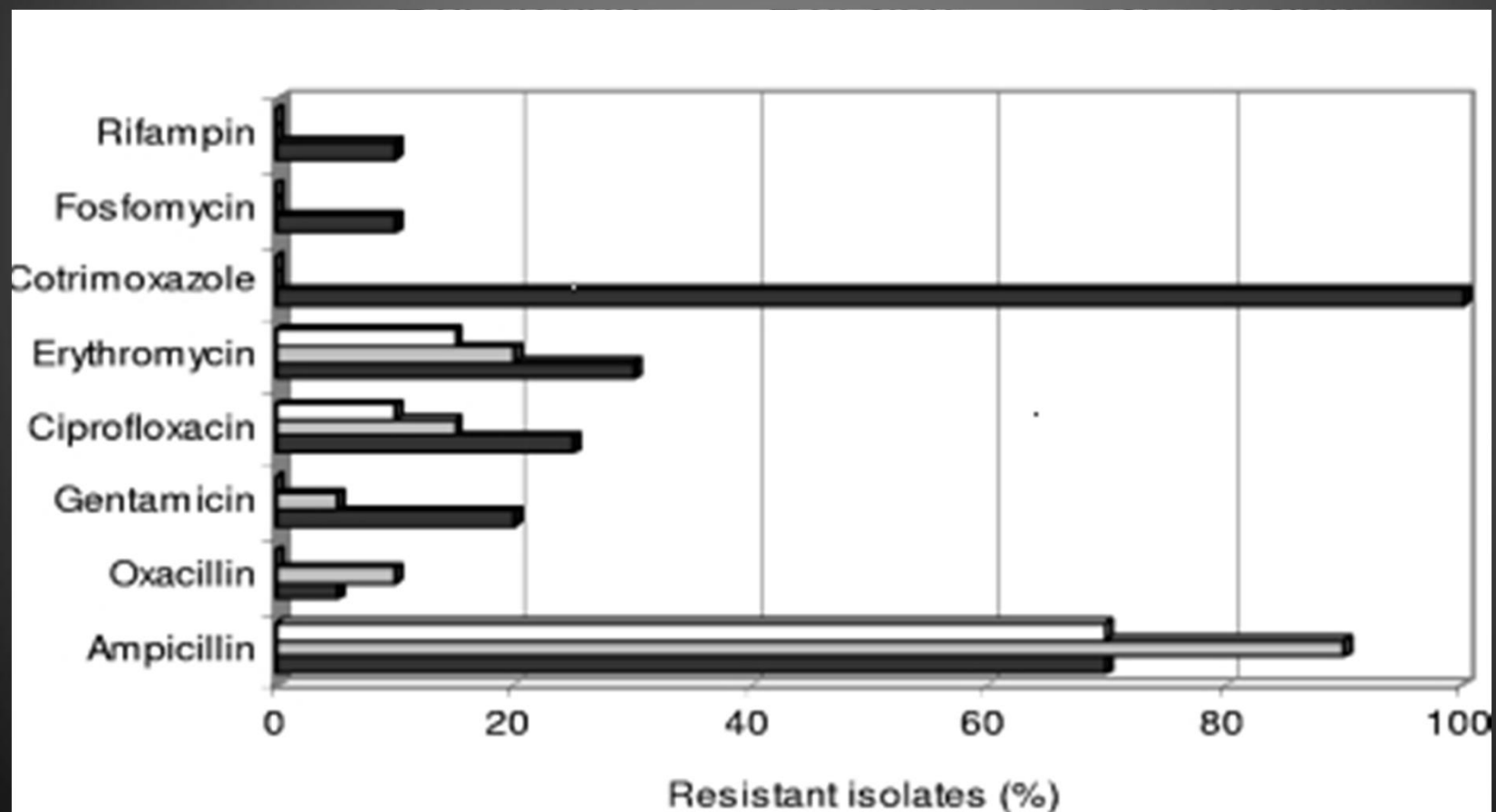
Test di chemiosensibilità

- non crescono su Mueller Hinton crescono su Agar Sangue MH
- non crescono nei sistemi automatizzati
- spesso resistenti al cotrimossazolo (SXT)

Profilo di resistenza di diversi morfotipi di *S. aureus*

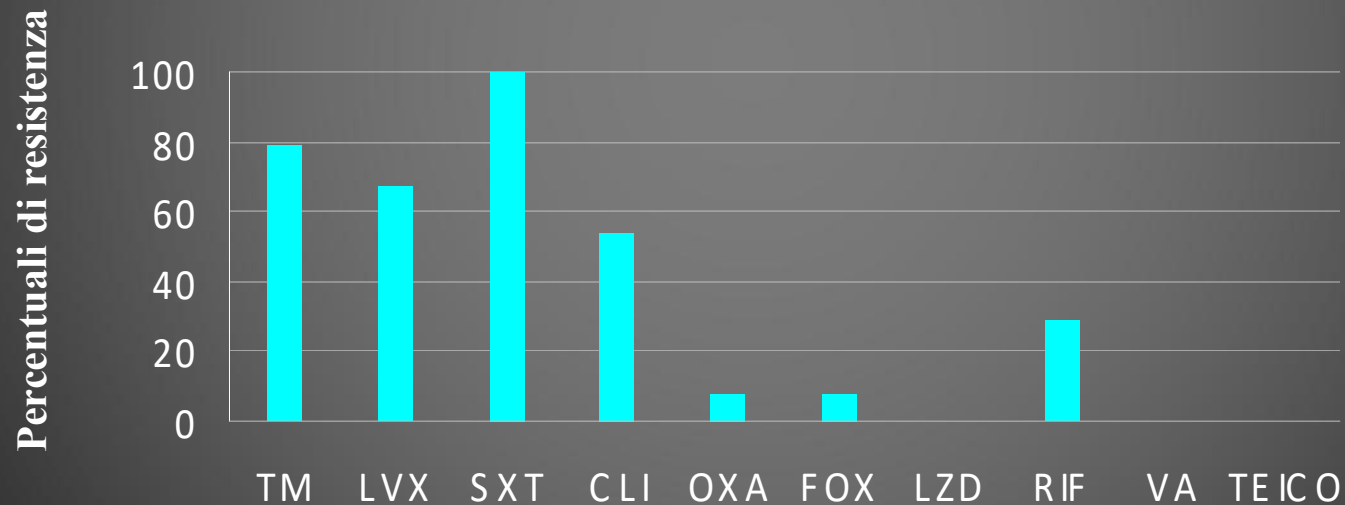
- **S.aureo CF (colonia piccola)**
- **S.aureo CF (colonia normale)**
- **S.aureo non CF (colonia normale)**

Besier S Antim Agents Chemother 2008



Problemi metodologici legati a *Staphylococcus aureus*

- Nel 2017 abbiamo isolato 24 ceppi di *S. aureus* SCV da altrettanti pazienti
- Due ceppi sono MRSA
- La totalità dei ceppi è resistente al trimet/sulfam





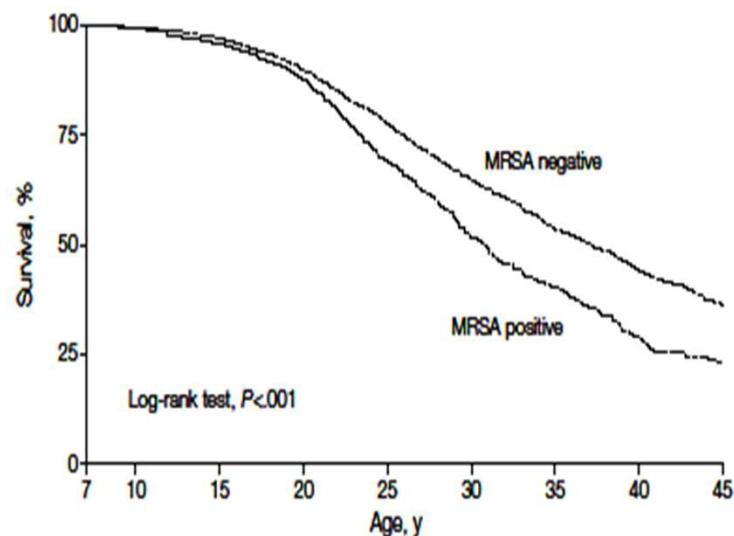
Grazie per l'attenzione!

IMPATTO CLINICO DI MRSA IN FC

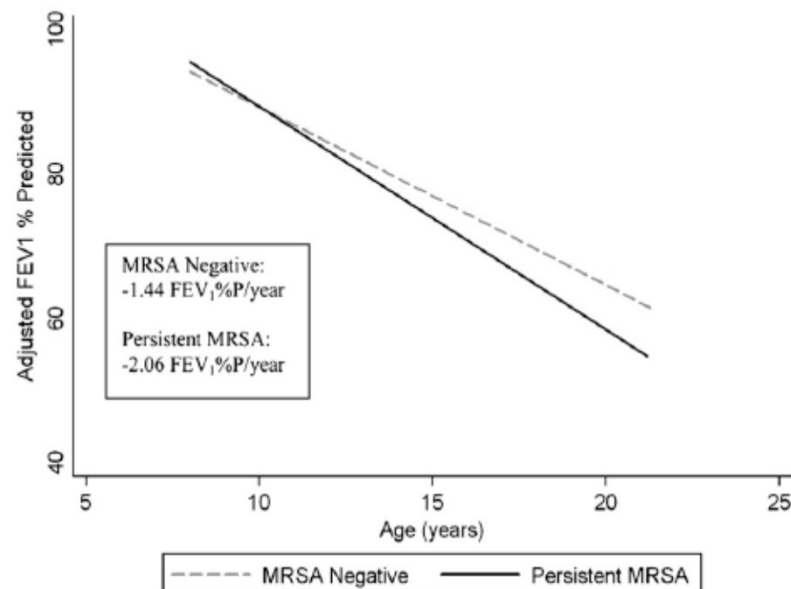
Correlazione fra infezione persistente da MRSA e decremento della funzionalità respiratoria (FEV1)

Dasenbrook et al, 2008

Figure 2. Kaplan-Meier Estimates of Survival According to MRSA Status (N=19 833)



No. at risk									
MRSA negative	942	5995	5735	4367	2605	1659	1142	779	456
MRSA positive	58	664	938	686	429	229	120	94	59

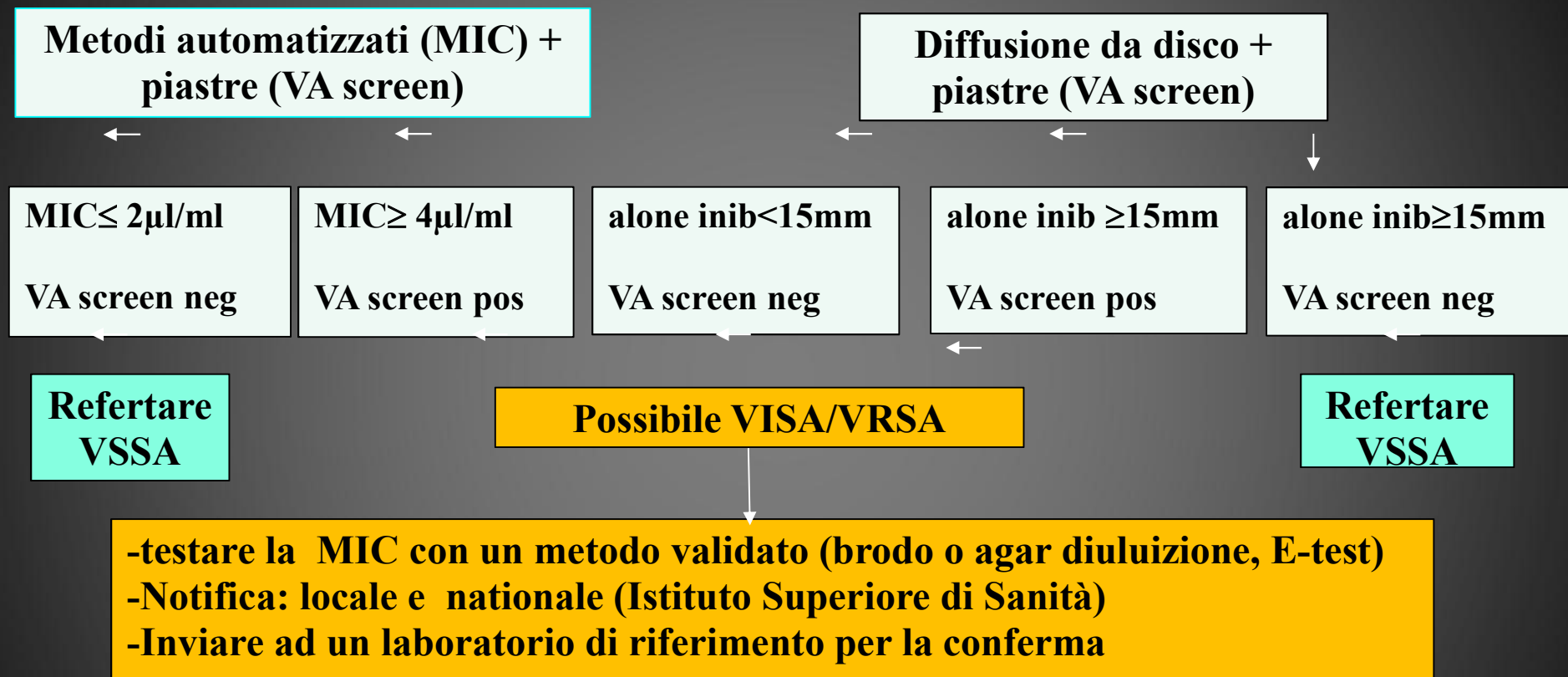


infezione persistente con MRSA in FC
influenza la sopravvivenza

Dasenbrook et al, 2010

ALGORITMO PER TESTARE LA SENSIBILITA' DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS ALLA VANCOMICINA

Infect Dis Special Edition 2008



CLSI break points vancomicina

Susceptible: ≤ 2 µg/ml (VSSA)

Intermediate: 4-8 µg/ml (VISA)

Resistant: ≥ 4 µg/ml (VRSA)

test diffusione: Sensibilità alone > 15mm

CLSI: Clinical and Laboratory Standard

VSSA: vancomycin-susceptible *S.aureus*

VISA: vancomycin-intermediate *S.aureus*

VRSA: vancomycin-resistant *S.aureus*

Test per la resistenza

ai farmaci glicopeptidici (CLSI 2009)
-Il test di diffusione da disco non è affidabile
(non sono riportati i diametri di breakpoint)

-E' necessario determinare la MIC(brodo diluizione, Agar diluizione, E test):

Sens. $\leq 2\mu\text{g/ml}$ (VSSA)

Int: $4-8\mu\text{g/ml}$ (VISA)

Resist: $\geq 4\mu\text{g/ml}$ (VRSA)



-Test commerciali di screening (VA screen Ditta BD)

6 $\mu\text{l/ml}$ di Vancomicina in Brain Heart Infusion Agar (BHI)

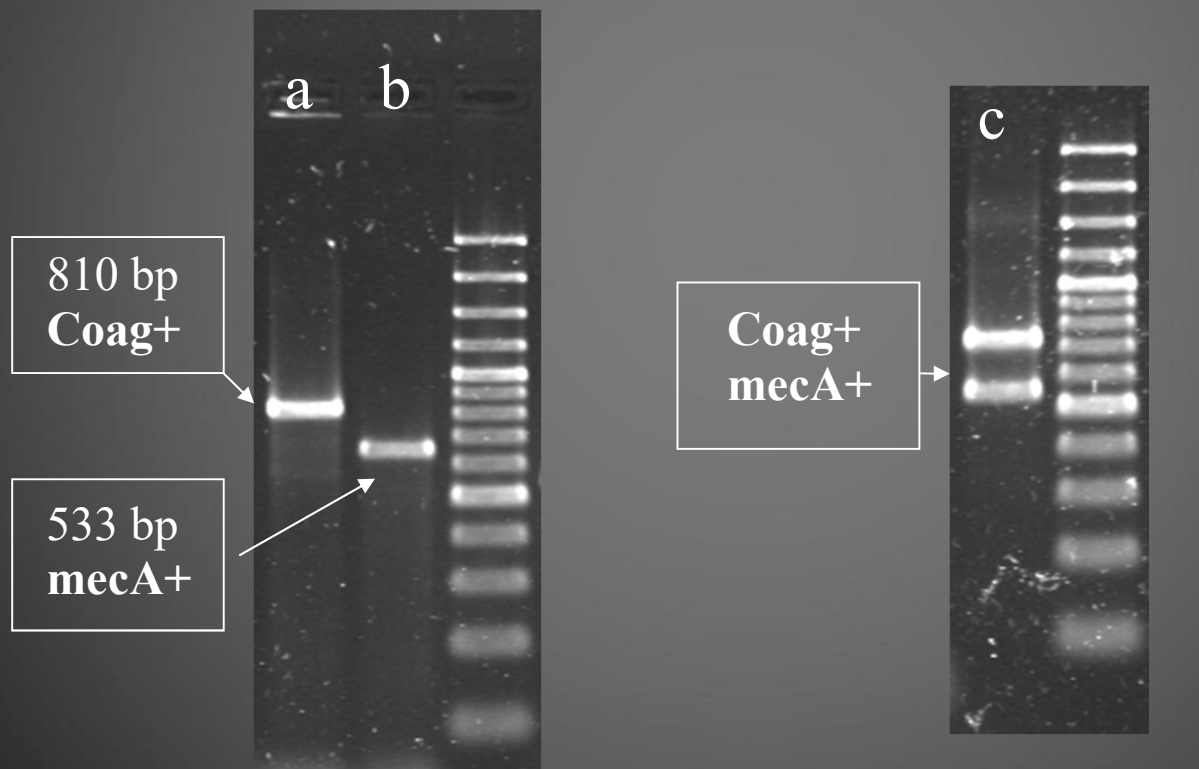
Inoculo standardizzato 0,5 McFarland

24 ore di incubazione a $35\pm 2^\circ\text{C}$

Crescita di 1 o più colonie è indice presuntivo di ridotta sensibilità

Perdita di alcuni ceppi con sensibilità intermedia ($4\mu\text{g/ml} < \text{MIC} < 6\mu\text{g/ml}$)

Test molecolari per confermare l'identificazione di *S. aureus* e MRSA



a: *S. aureus*

b: *S. non aureus* metic resist.

c: MRSA

Test per la resistenza ad oxacillina

Test di screening su piastra

Piastre con oxacillina 6µg/ml (MRSA screen Ditta BD, Oxa screen Ditta Biomerieux)

Inoculo batterico standardizzato a 0.5 McFarland

Incubazione: 24 ore

Crescita di 1 o più colonie: MRSA

Terreni cromogeni

Terreni in cui la crescita di MRSA è caratterizzata da una colorazione particolare

Confronto di 3 terreni cromogeni per l'identificazione di 70 ceppi di MRSA:

	<u>sens (24h)</u>	<u>sens (24h)</u>	<u>spec (48h)</u>	<u>spec (48h)</u>
ORSAB (Oxoid)	76	87	67	68
MRSA ID (Biomeriex)	76	90	97	95
MRSA Select (Bio-Rad)	77	91	96	79

Cherkaoui A. et. al .J Med Microbiol. 2007; 56:500-3

Test per la resistenza ad oxacillina (EUCAST)

- *S. aureus* con MIC di oxacillina >2 sono meticillino resistenti
(non sono riportati valori di breakpoint per MIC e diametri di inibizione)

S. aureus

MIC per cefoxitina >4 indica MRSA

con dischetti di cefoxitina 30 µg/ml

cefoxitina < 22 mm = MRSA

Test per la resistenza ad oxacillina (CLSI 2009)

- Test di diffusione da disco
- Agar diluizione, brodo diluizione (MIC)

Test di disco diffusione

Si esegue utilizzando i dischetti di:

oxacillina 1 µg/ml e/o cefoxitina 30 µg/ml

oxacillina ≤ 21 mm = MRSA

cefoxitina ≤ 10 mm = MRSA

Caso clinico di una pediatra dell'AOU Meyer con foruncolosi ricorrente



- Esame colturale
- **Materiale:** tampone nasale
- **data del campione** 12/1/2009
- **paziente** Medico Pediatra
- **Risultato:**
- Numerose colonie *Staphylococcus spp* (coagulasi negativo)

Caso clinico di una pediatra dell'AOU Meyer con foruncolosi ricorrente



Esame colturale

Materiale: tampone da materiale purulento
paziente Medico Pediatra

data del campione 5/1/2009

Risultato:

Numerose colonie *Staphylococcus* meticillino-resistente

Antibiogramma:

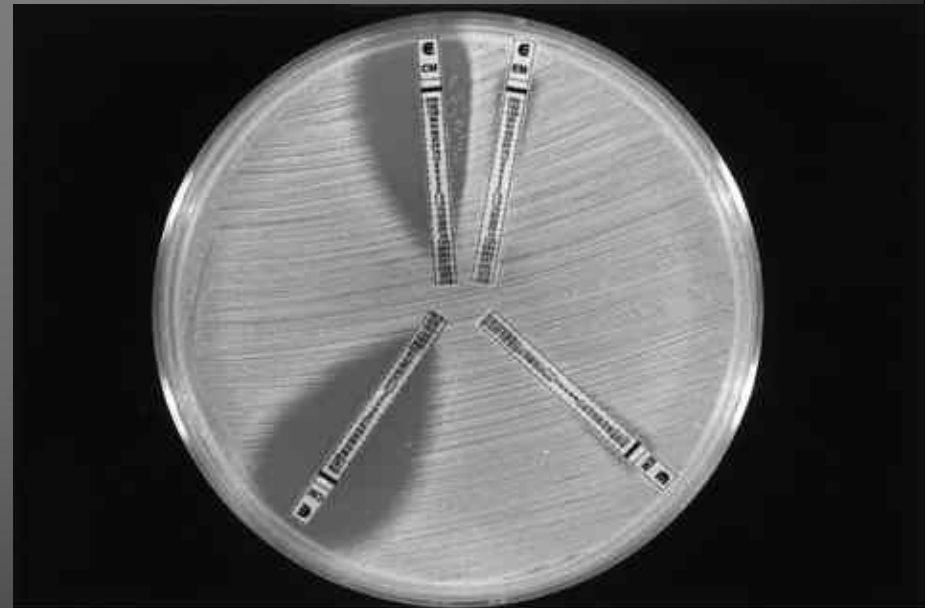
teicoplanina	S	eritromicina	R	doxaciclina	R
vancomicina	S	clindamicina	R	ceftazidime	R
cefuroxime	S	oxacillina	R	levofloxacin	R
amoxicillina	S	gentamicina	R	ciprofloxacina	R
linezolid	S	tobramicina	R	rifampicina	S

Analisi molecolare della cassetta SCCmec : **tipo IV**
(community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CA-MRSA)

Analisi molecolare per la tossina di Panton Valentine: **POSITIVO**

Test della suscettibilità alla clindamicina

- Alcuni fallimenti terapeutici della terapia con clindamicina sono dovuti alla presenza di una resistenza inducibile
- Tale tipo di resistenza necessita di un approccio specifico per essere evidenziata:
- card appositi nei sistemi automatizzati (Vitek)
- D test da eseguire ne caso di test di diffusione (manuale) :
la presenza di un altro macrolide (eritromicina) induce l'espressione della resistenza alla clindamicina



Quando sospettare un'infezione da CA-MRSA?

Comportamento epidemico

con diffusione non solo fra pazienti ma infezioni anche alle persone sane (personale ospedaliero)

Segni clinici

che possono far pensare alla produzione di tossine necrotizzanti

Profilo di chemiosensibilità

Sensibilità ai non beta lattamici

Nei casi sospetti inviare il ceppo o il campione respiratorio ad un laboratorio di riferimento che analizza se il ceppo è CA-MRSA e la produzione di Panton Valentine leucocidina

Test molecolari per confermare l'identificazione di *S. aureus* e MRSA

- Esistono test molecolari per confermare l'identificazione di *S. aureus* tramite amplificazione di frammenti genici specifici (es *coag*, *nuc*)
- Esistono test molecolari per confermare l'identificazione di MRSA tramite amplificazione di un frammento genico della cassetta *SCCmec* (*mecA*)

SLOW-VISA

Gli eteroVISA (hVISA) sono definiti da una MIC inferiore a 4 µg/ml

E' stata documentato un nuovo fenotipo di resistenza intermedia a vancomicina chiamata "slow VISA" caratterizzati da:

- 1) crescita lenta in 72 ore
- 2) Resistenza a concentrazioni di vancomicina superiori a quelle dei ceppi clinici di VISA (MIC \geq 8 µg/ml);
- 3) Il fenotipo di resistenza e la morfologia delle colonie sono instabili. Questo fenotipo è dovuto a mutazioni del gene *rpoB* o *rpoC*.

Studi di sequenziamento hanno dimostrato che i cloni slow VISA sono presenti in piccola percentuale nella popolazione di hVISA e proliferano in presenza di vancomicina. Tale popolazione può essere responsabile della persistenza delle infezioni persistenti da MRSA

Katayama Y. *et al.* Antimicrob Agents and Chemother.2017

Tipizzazione della cassetta SCCmec di isolati clinici di MRSA provenienti da 6 centri FC Italiani

<u>tipo I</u> n (%)	<u>tipo II</u> n (%)	<u>tipo III</u> n (%)	<u>tipo IV</u> n (%)	<u>Undet.</u> n (%)	<u>Profilo multiplo</u> n (%)	<u>Totale</u>
88 (49.4%)	2 (1.1%)	7 (3.9%)	56 (31.4%)	14 (7.8%)	11 (6.1%)	178

-Alta prevalenza del tipo IV che caratterizza CA-MRSA

-tutti gli isolati sono negativi per PVL

-genotipizzazione (MLST) ha evidenziato 9 cloni epidemici noti responsabili di garvi epidemie (es.USA300,USA500)

Deuremberg RH et al. Curr Molecul Med 2009

Community-Acquired MRSA cause earlier infection than Hospital Acquired MRSA in patients with cystic fibrosis

- I ceppi di MRSA (n=178) sono stati raccolti da 178 pazienti colonizzati su 2362 (7.5%) pazienti seguiti da nove centri FC Italiani
- E' stata determinata una alta prevalenza (36%) di CA-MRSA
- L'età media alla prima colonizzazione è di 11.8 anni per CA-MRSA (n=28) e 19.2 HA-MRSA (n=37). Tale differenza è statisticamente significativa ($p<0.05$).
- L'infezione da CA-MRSA avviene precocemente rispetto a HA-MRSA.
- Questi risultati possono avere importanti implicazioni per la prevenzione ed il trattamento dei ceppi di MRSA altamente patogeni in FC.



FFC#11/2007