

massimo resti

ANCONA
7 maggio 2016

Sessione sui “cocchi”.

Conoscere per combattere: su questo ci giochiamo la partita
Conoscere le strategie dei “cocchi” per farci ammalare
e applicare le strategie degli umani per non farsi
invadere dai “cocchi”

Vaccinando su e giù per lo stivale

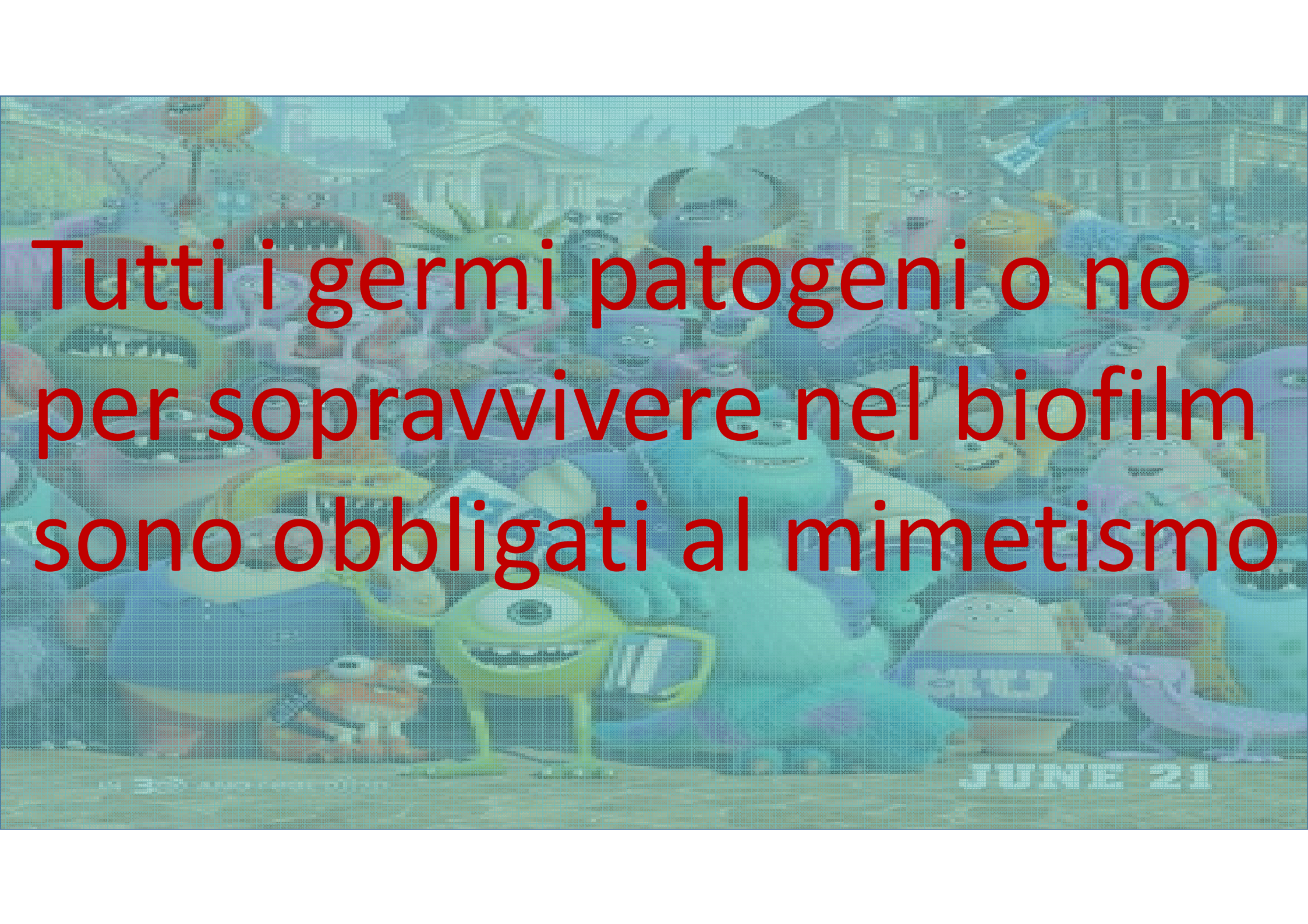
2^a edizione

Biofilm





Il trasformista



Tutti i germi patogeni o no
per sopravvivere nel biofilm
sono obbligati al mimetismo

IN 303 JUNO 2010

JUNE 21

ARTICLE

Received 19 Mar 2014 | Accepted 21 Aug 2014 | Published 30 Sep 2014

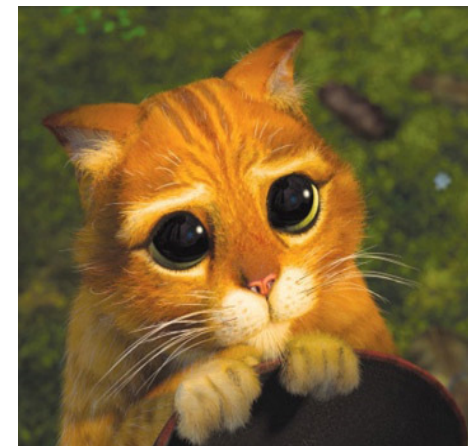
DOI: 10.1038/ncomms6055

OPEN

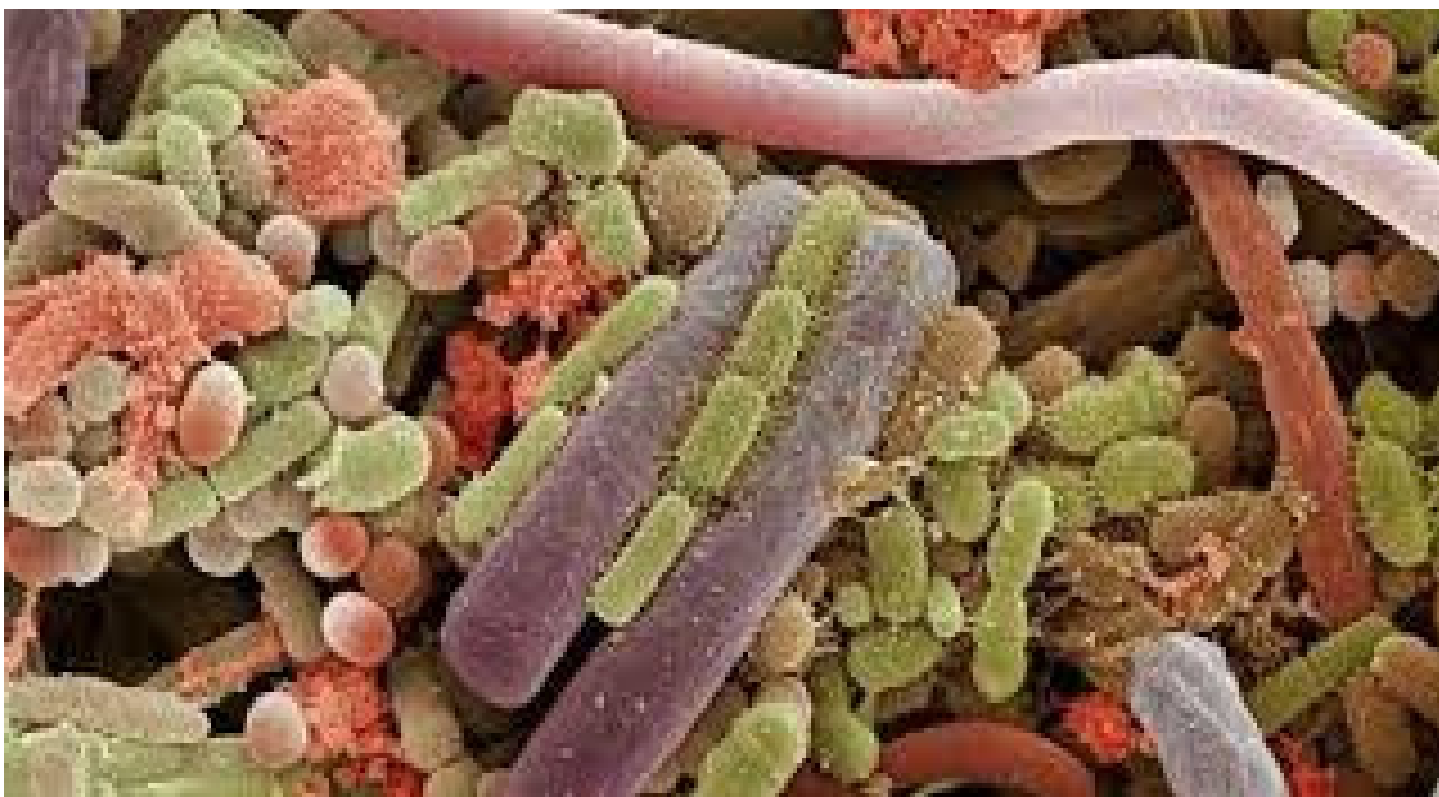
A random six-phase switch regulates pneumococcal virulence via global epigenetic changes

Ana Sousa Manso^{1,2}, Melissa H. Chai³, John M. Attack⁴, Leonardo Furi^{1,2}, Megan De Ste Croix¹, Richard Haigh¹, Claudia Trappetti³, Abiodun D. Ogunniyi³, Lucy K. Shewell⁴, Matthew Boitano⁵, Tyson A. Clark⁵, Jonas Korlach⁵, Matthew Blades⁶, Evgeny Mirkes⁷, Alexander N. Gorban⁷, James C. Paton³, Michael P. Jennings^{4,*} & Marco R. Oggioni^{1,2,*}

c'è un gruppo di geni che, come la pozione del dottor Jeckyll e mister Hyde, che trasforma lo pneumococco da batterio killer responsabile della polmonite e di una forma di meningite a batterio inoffensivo che vive tra gola e naso



Biofilm



Mimetismo:

- rallentano il metabolismo
- inibiscono la produzione della capsula
- bloccano la sintesi di pneumolisina



Il lupo e l'agnello
pasciranno assieme,
il leone mangerà la
paglia come il bue,
e il serpente si nutrirà
di polvere.

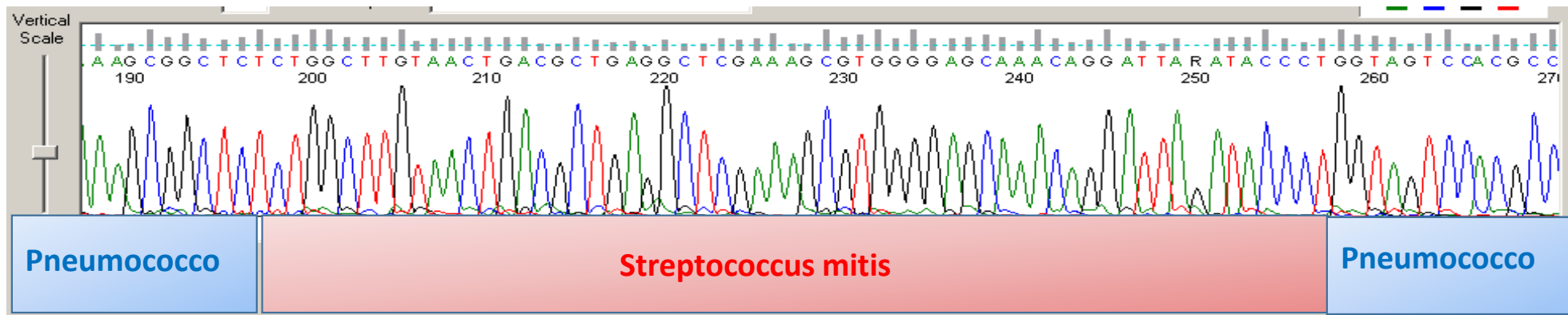
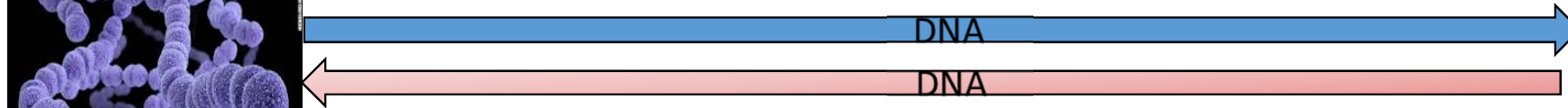
Is 65, 25



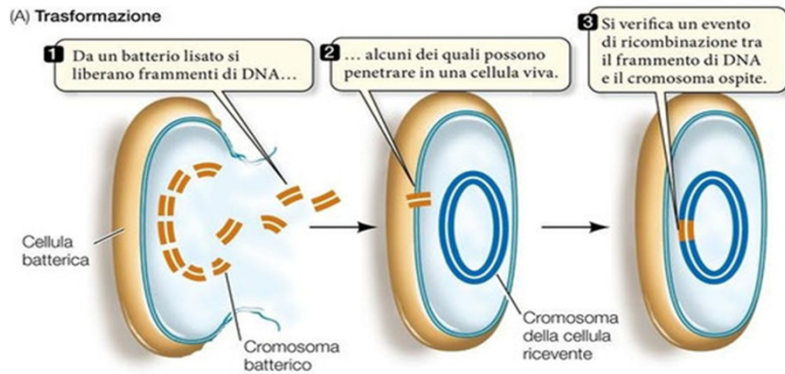
Pneumococco



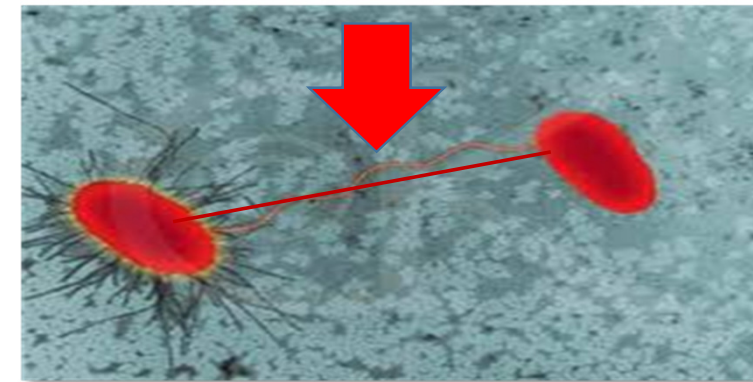
Streptococcus mitis



trasformazione

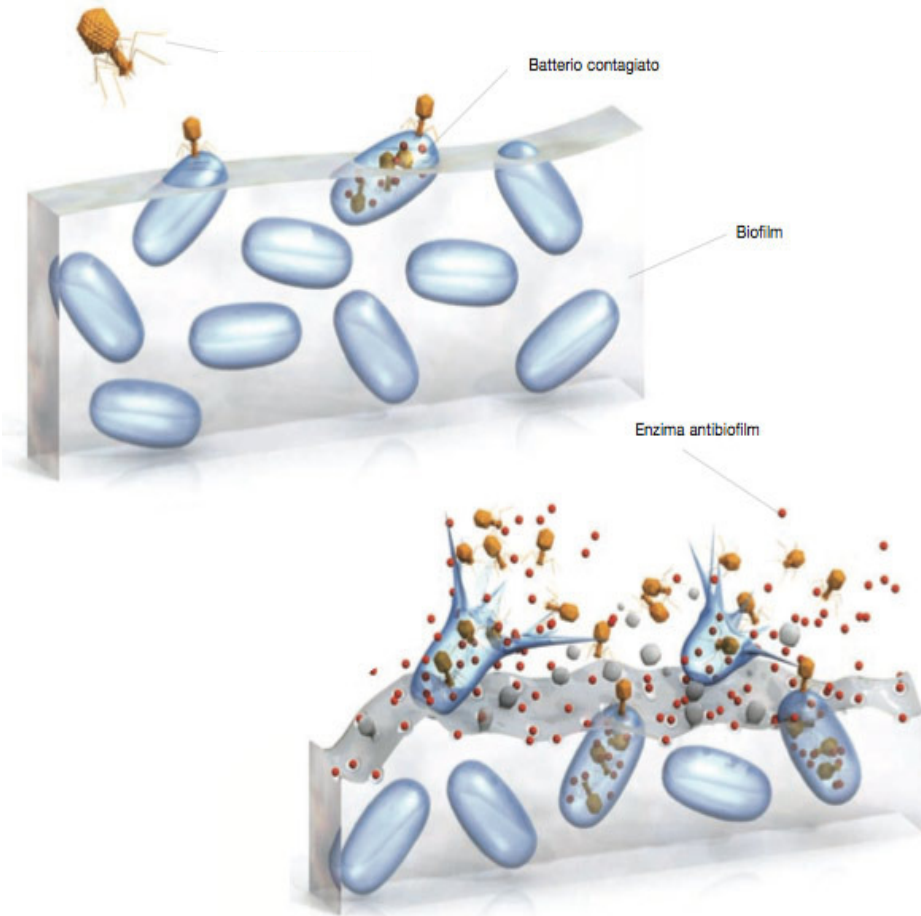


coniugazione



Infezione virale (Influenza)

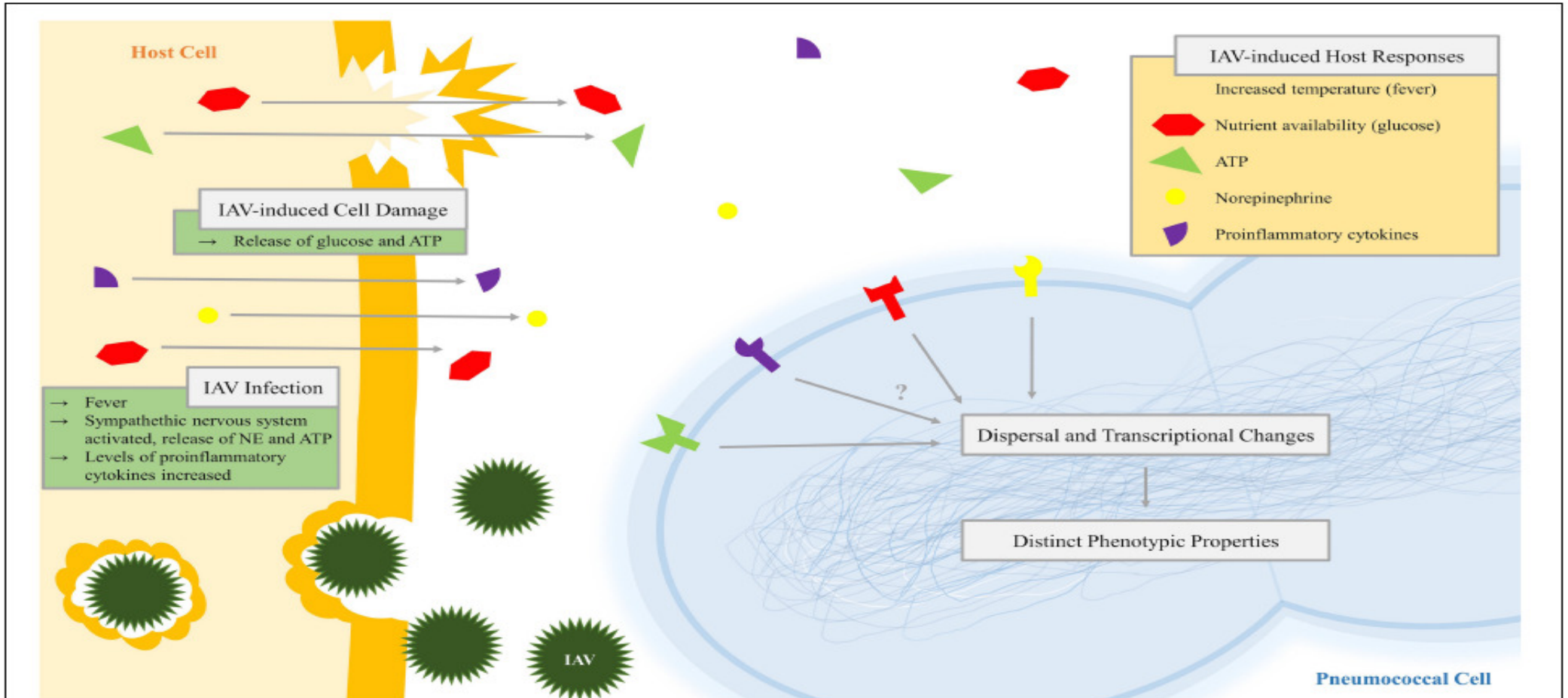
commensali



SGRUNT!



**patogeni
virulenti**

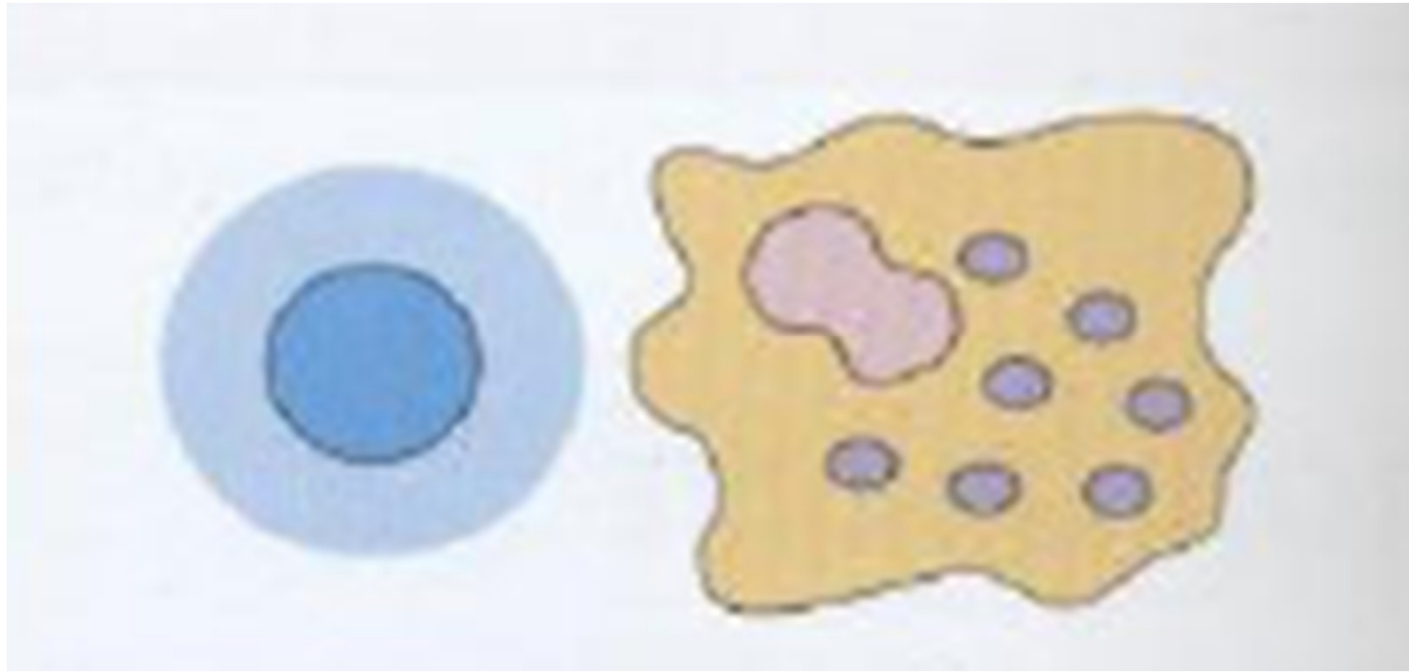


- riattiva il metabolismo



- riproduce la capsula
- riprende la sintesi di pneumolisina e altre endo e
eso tossine

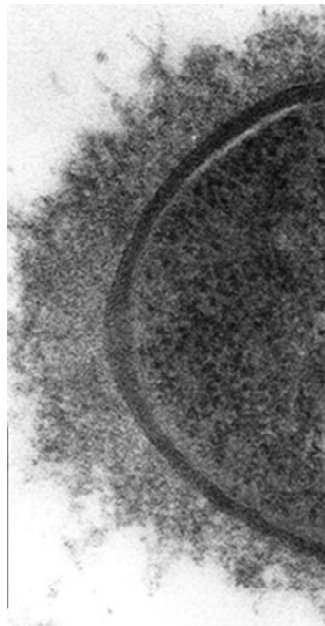
La capsula ostacola la fagocitosi, tanto più è grande tanto più si esprime questo ostacolo



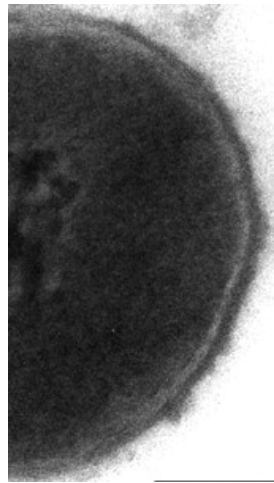
Esempio pneumococco sierotipo 3

Fattori di virulenza

capsula



Capsula sierotipo 3



Capsula sierotipo 6A

severity of meningitis in an infant rat meningitis model does depend on the capsule type and that a capsule is necessary to establish meningitis.

Streptococcus pneumoniae capsule determines disease severity in experimental pneumococcal meningitis Open Biology Published 23 March 2016



Pneumococco:
Germe gram positivo con eterogeneità della capsula polisaccaridica e questo è un importante meccanismo di difesa perché si hanno oltre 90 sierotipi con assente o modesta immunità crociata

- **Produzione di esoenzimi:**

Ialuronidasi

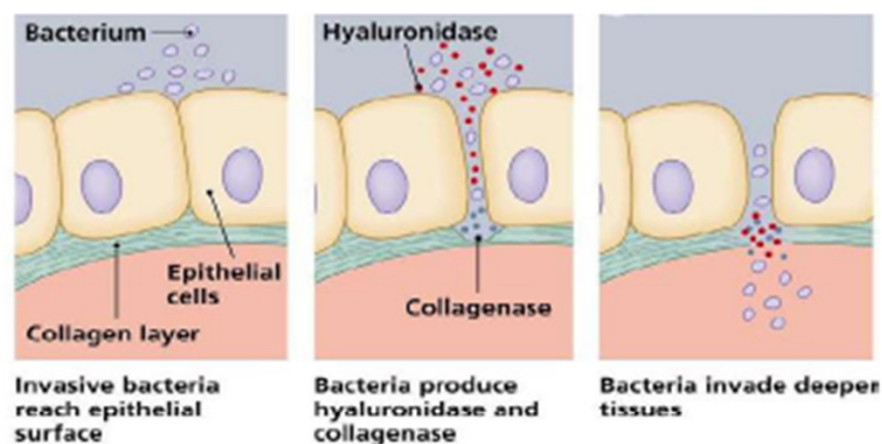
Coagulasi e Streptokinasi

Collagenasi

Proteasi

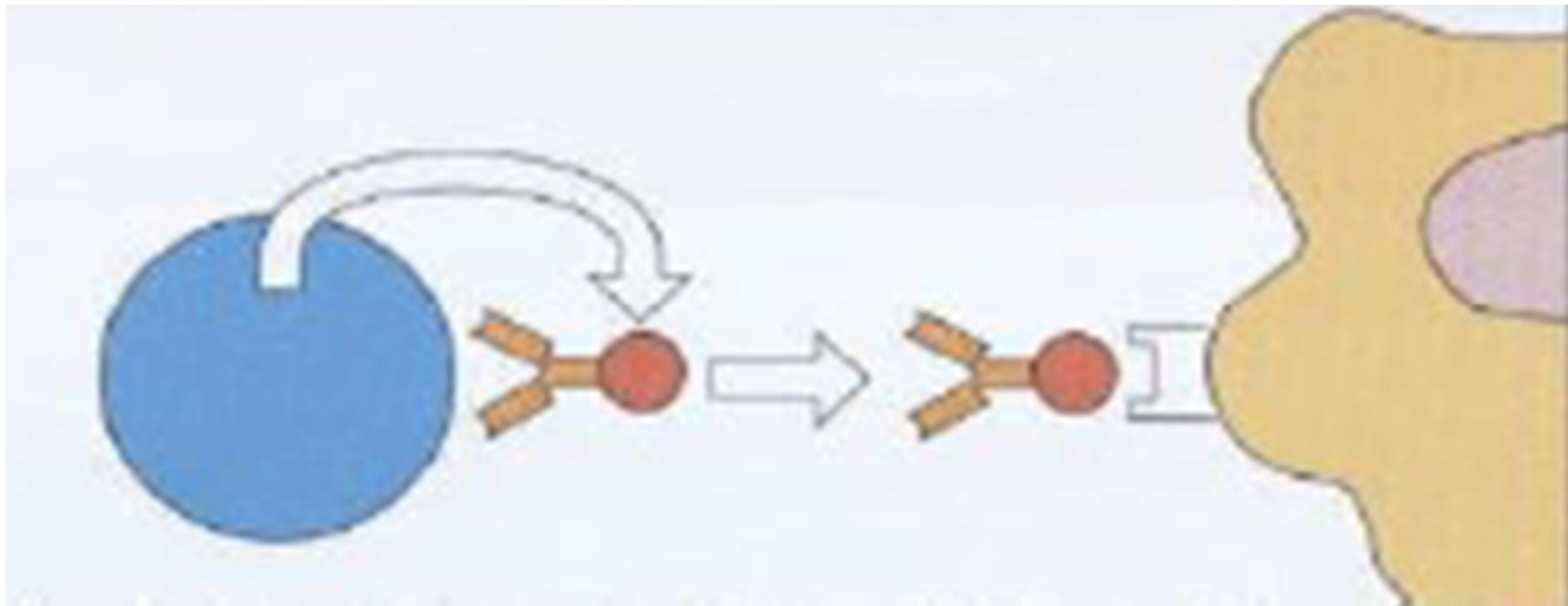
DNAasi

Lipasi



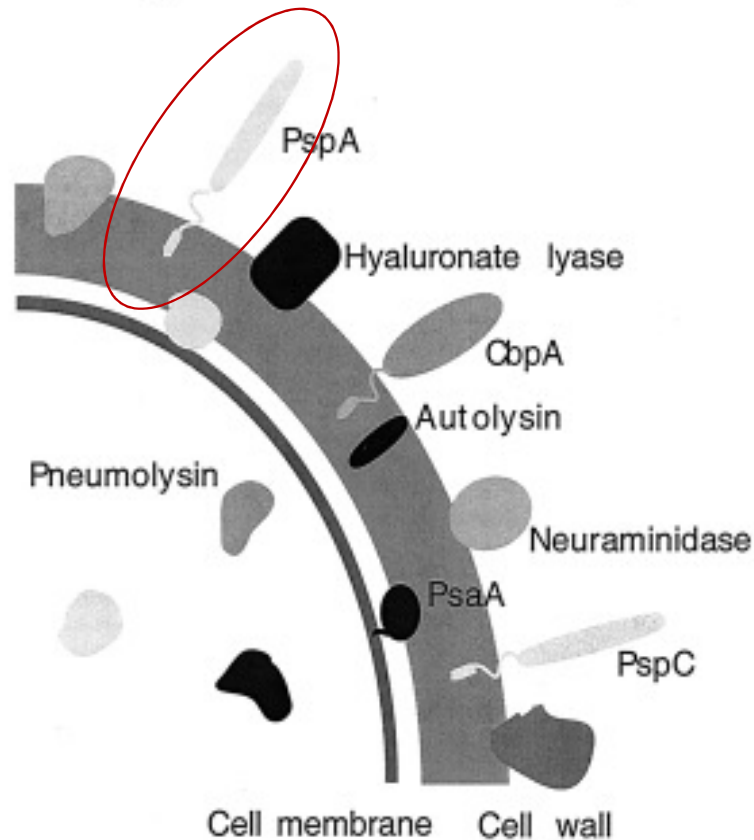
Tutti questi enzimi sono in grado di favorire l'apertura di varchi nei tessuti, che consentono la diffusione dei batteri che li producono.

Alcuni «cocchi» producono la proteina A che impedisce l'opsonizzazione degli anticorpi e quindi la fagocitosi



PNEUMOCOCCAL SURFACE ANTIGEN A

Schematic diagram of the virulence factors of *S. pneumoniae*.

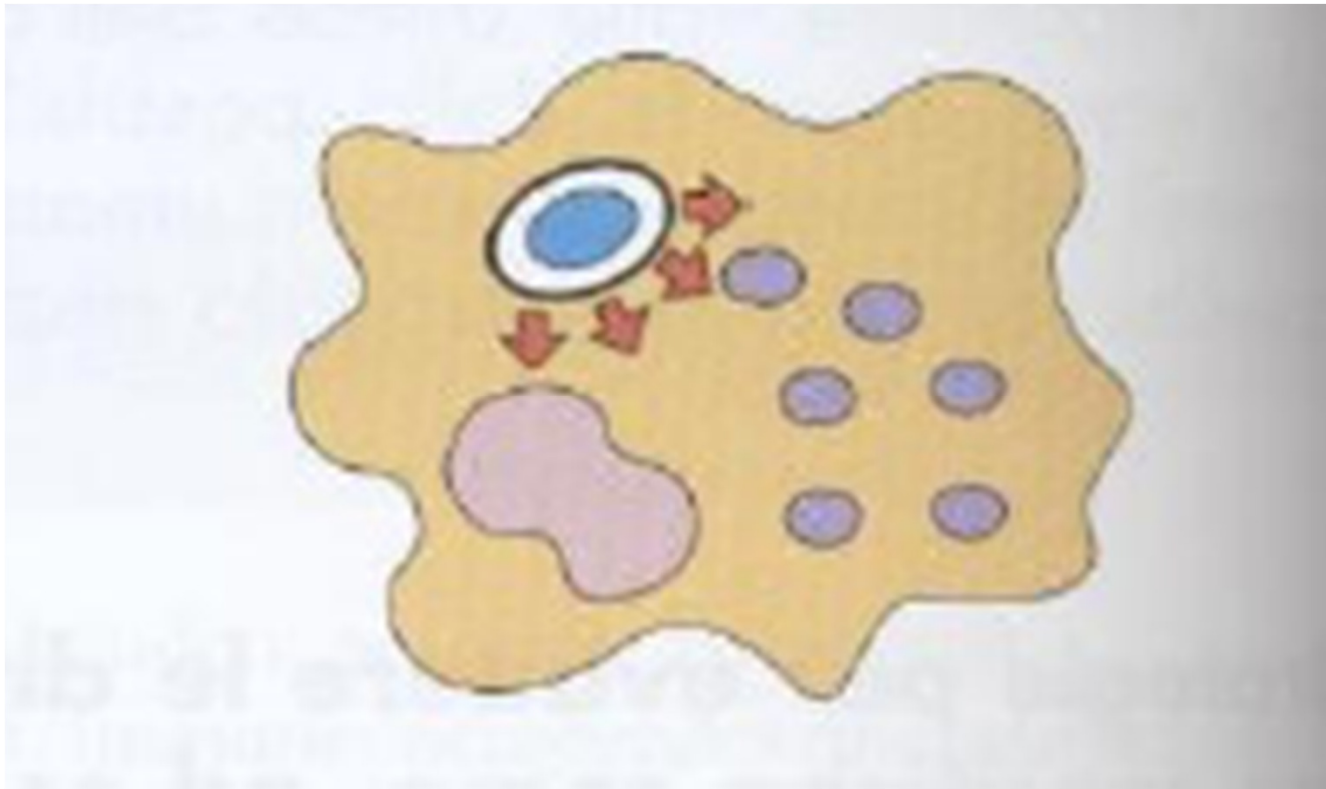


Mark J. Jedrzejas Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001;65:187-207

Proteina di membrana
Trasportatore di Mn^{2+} Zn^{2+}

PspA: riduce l'attività del complemento e inibisce la fagocitosi dei neutrofili.
Sistema di protezione contro il Sistema del complemento dell'ospite

Il microorganismo una volta fagocitato resiste al killing producendo antiossidanti

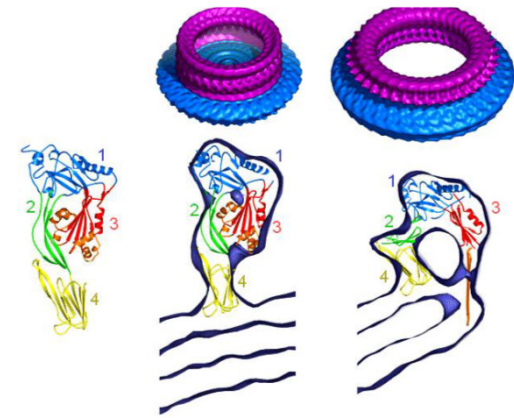


Esempio catalasi stafilococco

Fattori di virulenza: **tossine**

Pneumolisina

- Citolisina colesterol-dependente
- Rilasciata durante la lisi degli pneumococchi



35–47 monomeri

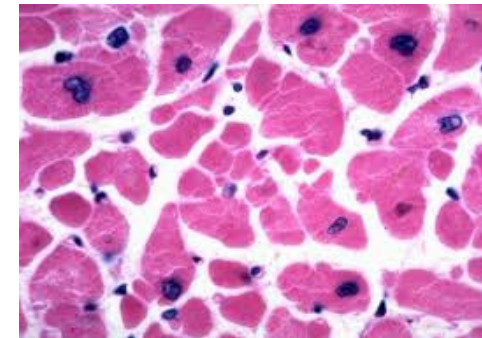
DNA damage rottura doppia elica
Morte cellulare

Danno alla barriera tra alveoli e capillari



Danno al tessuto cardiaco

Attiva il processo pro-infiammatorio e la produzione di composti tossici di O₂ e N che danneggiano i tessuti



Antibiotici beta lattamici bloccano la sintesi della parete



morte del batterio rilascio pneumolisina

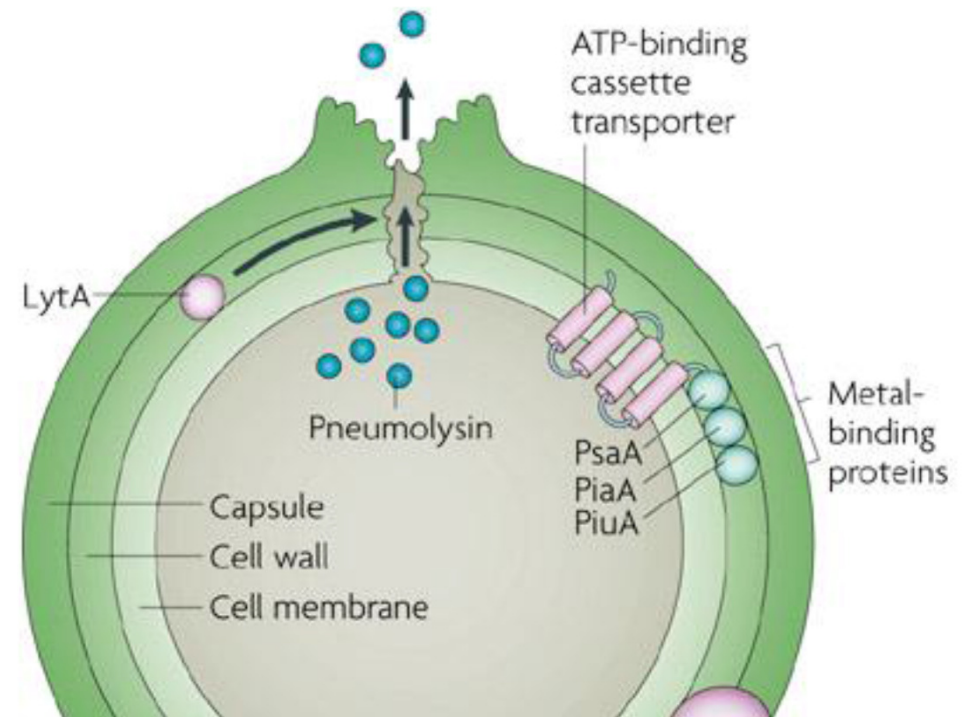


danno tissutale e apoptosi



gli pneumococchi sopravvissuti per dosi insufficienti di farmaco trovano il danno tissutale e quindi possono causare infezioni più diffuse

Antibioticoterapia a dosi inadeguate:
« do un po' di antibiotico... »



Come fa il meningococco a causare infezione?

1. Possiede proteine di adesione all'epitelio (anche pili)
2. Ha IgA proteasi che distruggono le IgA
3. Possiede fattori che inibiscono l'attività ciliare
4. Ha capsula polisaccaridica che impedisce la fagocitosi
5. Produce endotossine

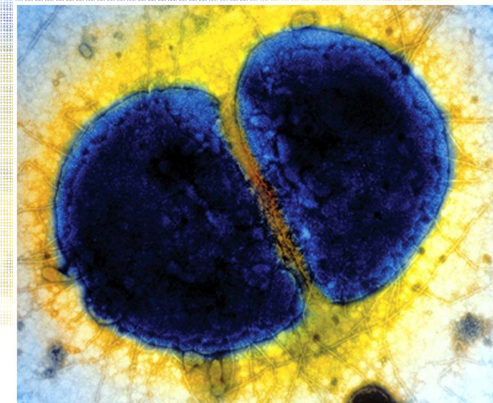
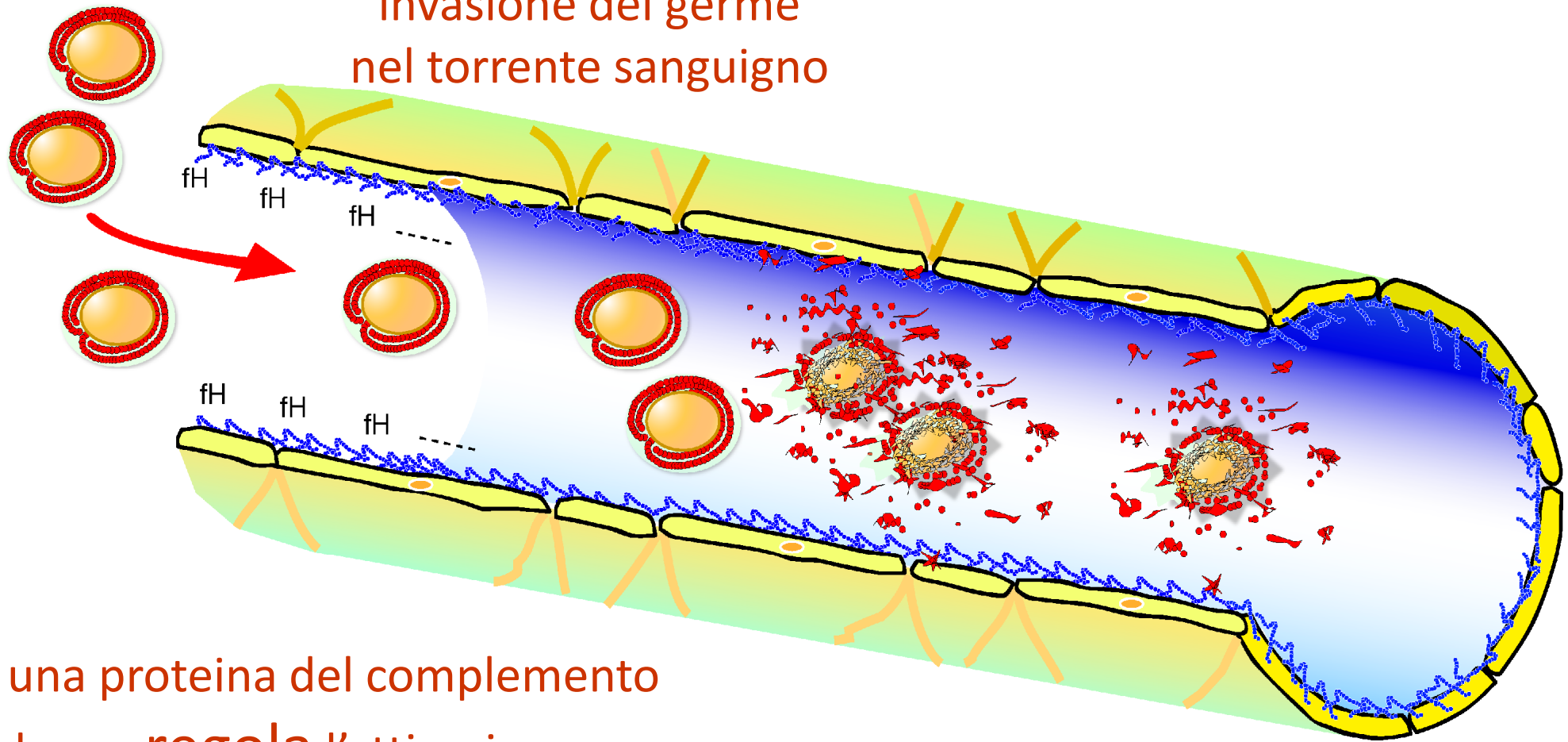


Figure 4-2a part 2a Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

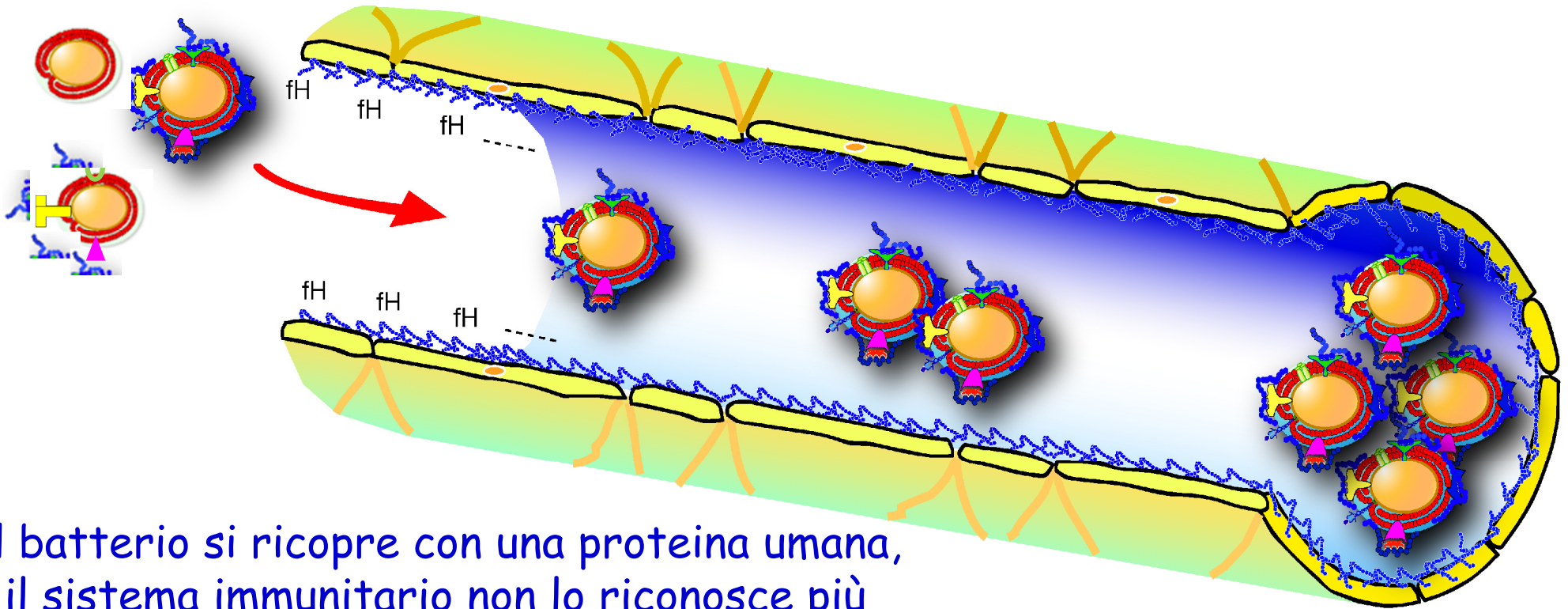
invasione del germe
nel torrente sanguigno



fH è una proteina del complemento
che ne **regola** l'attivazione

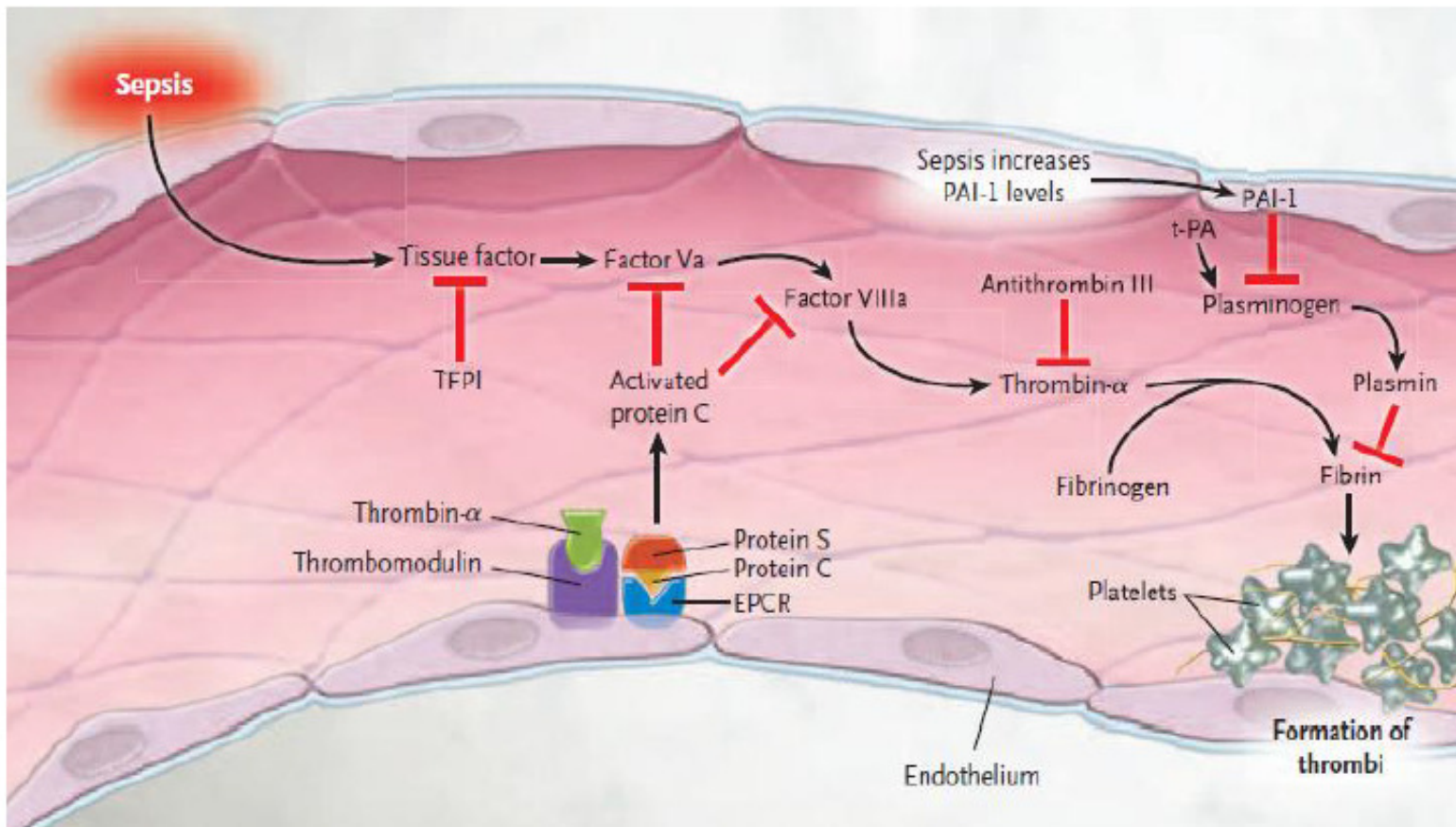
Lisi Complemento Mediata

Il Meningococco B ha una proteina **fHbp** che può legarsi al fattore H umano



Il batterio si ricopre con una proteina umana,
il sistema immunitario non lo riconosce più

fHbp lega solo il fattore H umano.
Per questo l'infezione da Meningococco è specie-specifica!



la risposta immune
alla sepsi
meningococcica causa
una attivazione
generalizzata delle vie
dell'inflammazione e
una **coagulazione
intravascolare
disseminata** che è la
principale causa di
morte

Correlazione tra carica batterica ed evoluzione

	CT liquor		CT sangue	
Pneumococco Decessi	16,5	100 volte + alta	24	1000 volte + alta
Pneumococco Esiti	17,8		26,3	
Pneumococco Non esiti	24		34	
Meningococco Decessi	27,5	ndn	19	> 1000 volte + alta
Meningococco esiti			23	
Meningococco Non esiti	25,6		33	

Neisseria meningitidis: la virulenza, non solo capsula

Multilocus Sequence Typing

tecnica tipizzazione molecolare

basata sulla PCR e l'analisi delle sequenze nucleotidiche utile per l'analisi di cluster dei focolai epidemici (quindi sia per la diagnostica che per la sorveglianza delle meningiti da *N. meningitidis*).

La sequenza di 7 precisi geni correla con la virulenza che è sierotipo indipendente

**Il genotipo ST11
è marcatamente virulento:**



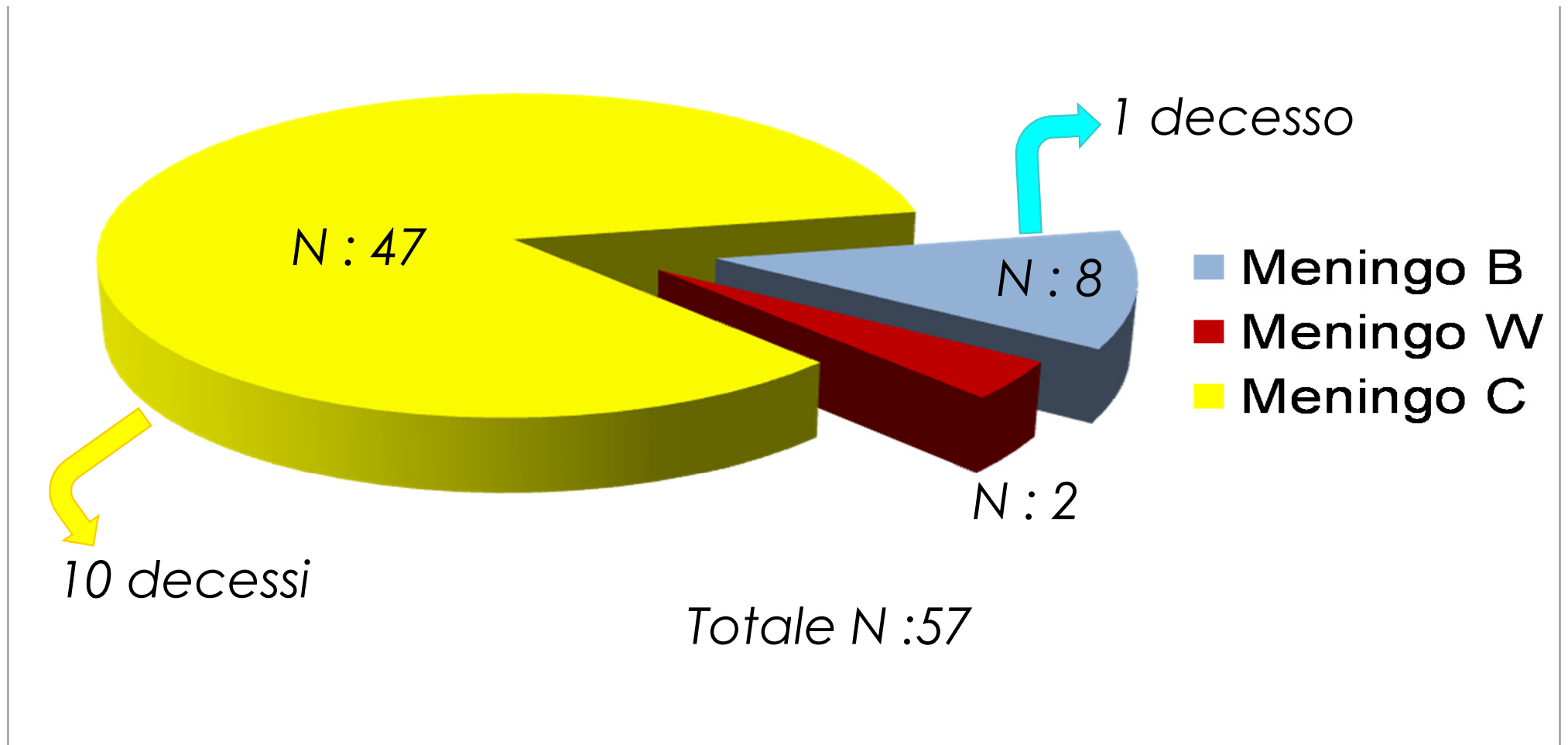
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 17; 95(6): 3140–3145.
Microbiology

PMCID: PMC19708



Meningiti Meningococciche in Toscana gennaio 2015- 2016

(aggiornate al 15 aprile 2016)



Multilocus Sequence Typing

tecnica tipizzazione molecolare basata sulla PCR e l'analisi delle sequenze nucleotidiche.

Sequence Typing Complex (ST)

Sono stati identificati 7 “housekeeping genes” (geni costitutivi indispensabili alla sopravvivenza del batterio), nei quali il polimorfismo di alcuni nucleotidi determina variazioni che si traducono in determinati fenotipi che hanno un diverso potenziale patologico e variabile virulenza

- abcZ
- adk
- aroE
- fumC
- gdh
- pdhC
- pgm

Ognuno di questi geni può avere centinaia di mutazioni



Outbreak meningococco 2015- 2016

aggiornato al 13.4.2016



Regione Toscana

Maggiore virulenza: Clonal Complex ST11

57 casi

Solo **17** positivi in coltura

8 meningococco B 1dx

2 meningococco W

47 meningococco C 10 dx

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm
2	3	4	3	8	4	6

Options

Search:

Display/sort options

Order by: as

Display: records per page

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm	clonal complex
11	2	3	4	3	8	4	6	ST-11 complex/ET-37 complex

abcZ
adk
aroE
fumC
gdh
pdhC
pgm

2	2
3	3
4	4
3	4
8	8
4	4
6	6

Sequence
Typing
11

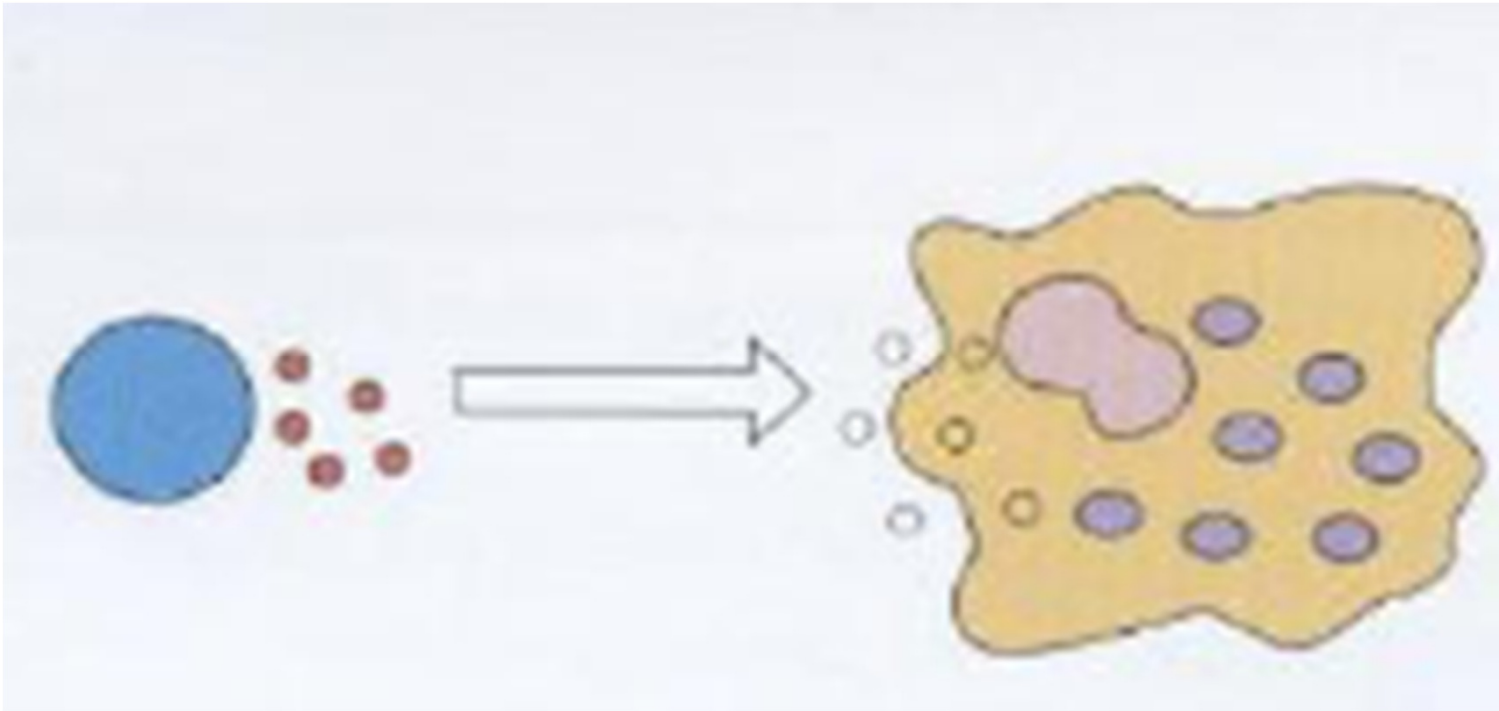
Sequence
Typing
2780

N° casi 45
Clonal Complex ST

43
**molto
virulento**

2
**poco
virulento**

I microrganismi rilasciano tossine
che uccidono il fagocita



Esempio la leucocidina dello
stafilococco aureo

Martina 2 mesi

*An fam: un fratello adolescente con acne pustolosa.
An fisio: ndn*

7 aprile

**rinite , disappetenza
irrequietezza**

**Medico curante: faringite
lavaggi nasali e tachipirina**

8 aprile

**febbre, disappetenza,
irrequietezza**

PS: Confermata terapia in atto

10 aprile

**rinite , disappetenza
irrequietezza, calo ponderale
Torcicollo**

**Medico curante: Confermata terapia
in atto
ma sospetta S. Sandifer: Ranitidina**

Martina 2 mesi

10 aprile ore 14

Grave scadimento delle condizioni generali

Iperpiressia anoressia con calo ponderale

Ricovero c/o Ospedale

Esami ematici

GB 33900/ μ L, N 84%,

PCR 34.5 mg/dl

Faringotonsillite: inizia Terapia con Ceftriaxone

Il giorno dopo 11 aprile

Aggravamento delle condizioni generali, dispnea ingravescente grave torcicollo

Martina 2 mesi

RX torace : nella norma, Ecografia transfontanellare: ndn

Rachicentesi: liquor limpido, esame batterioscopico e colturale negativo

Tc del collo con mdc : estesa componente fluida ad epicentro nello **spazio retrofaringeo** ad estensione nello **spazio cervicale anteriore**, **nel compartimento prevertebrale anteriore**, in sede laterocervicale e sovraclaveare fino a presentare la sua estremità più caudale nel **mediastino anterosuperiore**. Morfologia polilobulata costituita da varie componenti confluenti. **Effetto massa** rispetto alle strutture circostanti ed in particolare la colonna aerea che **dall'ipofaringe alla trachea appare ridotta di calibro**. Deviate le strutture vascolari del collo

Name:ARRIGHI MARTINA
ID:ME2080291
DoB:21/01/2012
Date:12/04/2012
Time:19:05:52
No.:23
x 1.33

Inst:OSP.PED.MEYER FI
Model:Brilliance 64
23

4.85 cm

AcqNo:
SL:44.00
ST:2.00
CS:
TI:426
kV:80.00
mA:114
Feed:

CM:
GT:0.00
ImC:SAG
W: 00399
C : 00082

Name:ARRIGHI MARTINA
ID:ME2080291
DoB:21/01/2012
Date:12/04/2012
Time:19:08:39
No.:36
x 1.33

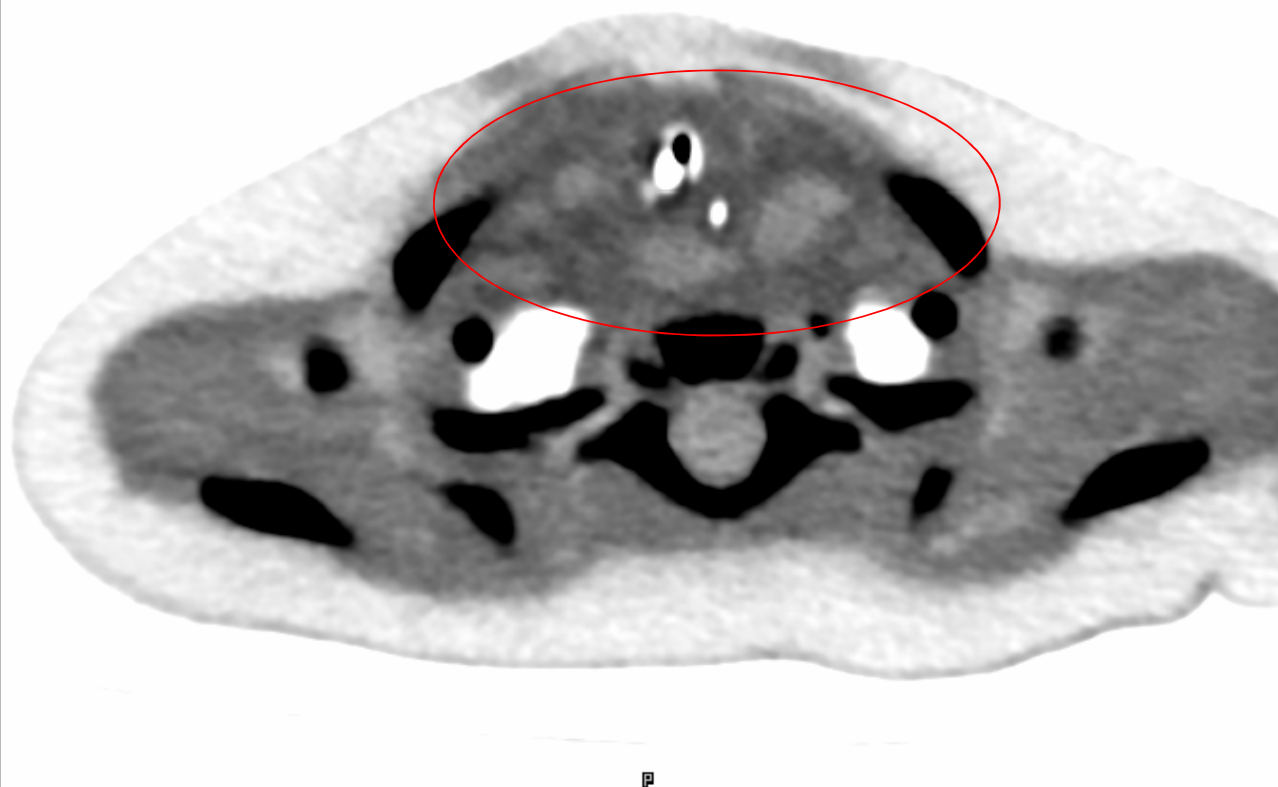
Inst:OSP.PED.MEYER FI
Model:Brilliance 64
36



Name:ARRIGHI MARTINA
ID:ME2080291
DoB:21/01/2012
Date:12/04/2012
Time:19:08:39
No.:18
x 1.33

Inst:OSP.PED.MEYER FI
Model:Brilliance 64
18

Mediastinitis



R
AcqNo:
SL:374.40
ST:2.00
CS:
TI:426
kV:80.00
mA:111
Feed:

CM:CONTRAST
GT:0.00
ImC:1ard
W: 00400
C : 00060

*Martina aveva un ascesso retrofaringeo
con linfadenopatia necrotico
colliquativa trasformato in ampia
colliquazione e mediastinite*

Martina 2 mesi

13 aprile

incisione della fascia bucco-faringea, **fuoriuscita di
abbondante pus**

**esame colturale
materiale
purulento di
drenaggio**

POSITIVO per *Stafilococco aureus*

Esame colturale aerobi

POSITIVO

N.B. In questo materiale si ricercano, in assenza di richiesta specifica, batteri aerobi e miceti a rapida crescita.

POSITIVO

<i>Microorganismo</i>	<i>Carica</i>
1 Staphylococcus aureus	>100000 UFC/ ml

Antibiogramma

<i>ANTIBIOTICI</i>	1	
Clindamicina	S	<=0,25
Daptomicina	S	0,25
Eritromicina	S	<=0,25
Fosfomicina	S	<=8
Acido Fusidico	S	<=0,5
Gentamicina	S	<=0,5
Levofloxacin	S	<=0,12
Linezolid	S	1
Nitrofurantoina	S	<=16
Rifampicina	S	<=0,5
Teicoplanina	S	<=0,5
Tetraciclina	S	<=1
Tigeciclina	S	<=0,12
Trimetoprim/Sulfam.	S	<=10
Vancomicina	S	<=0,5
Penicillina G	R	>=0,5
Oxacillina	S	<=0,25

Stafilococco aureus MRSA

Esame colturale aerobi

POSITIVO

N.B. In questo materiale si ricercano, in assenza di richiesta specifica, batteri aerobi e miceti a rapida crescita.

POSITIVO

Microorganismo

1 Staphylococcus aureus

Carica

>100000 UFC/ ml

IDENTIFICAZIONE BATTERICA MOLECOLARE

PCR Specie-Specifica

*L'ISOLATO E' RISULTATO POSITIVO AL TEST MOLECOLARE PER LA RICERCA DI GENI
PER LA PRODUZIONE DI LEUCOCIDINA DI PANTON-VALENTINE.*

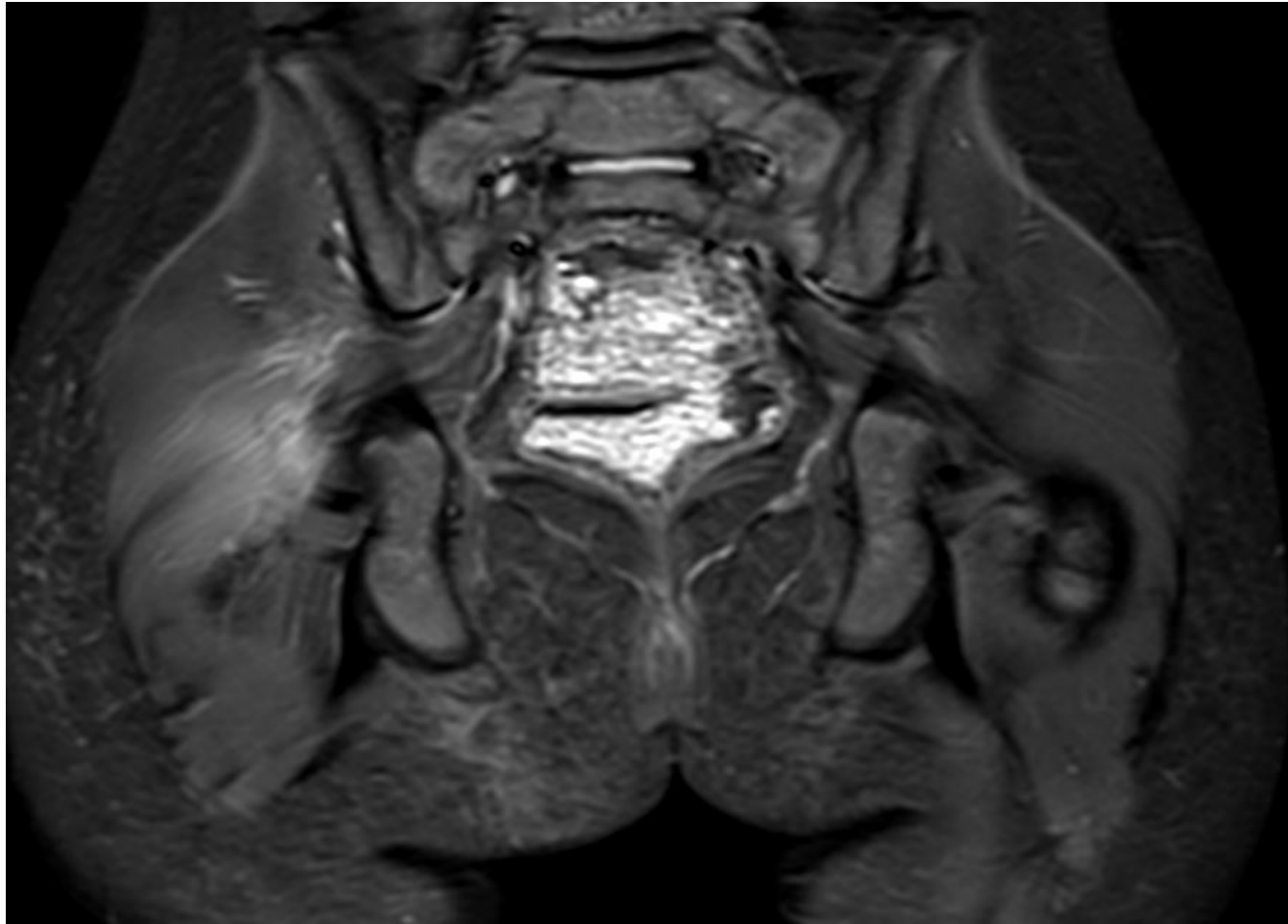
Barbara 4 a

Foruncolosi agli arti

Presentazione clinica: febbre e
rifiuto della deambulazione

**RMN: PIOMIOSITE GLUTEA
DESTRA**

RT-PCR: Stafilococco MR
PVL +



Samuele, 19 mesi

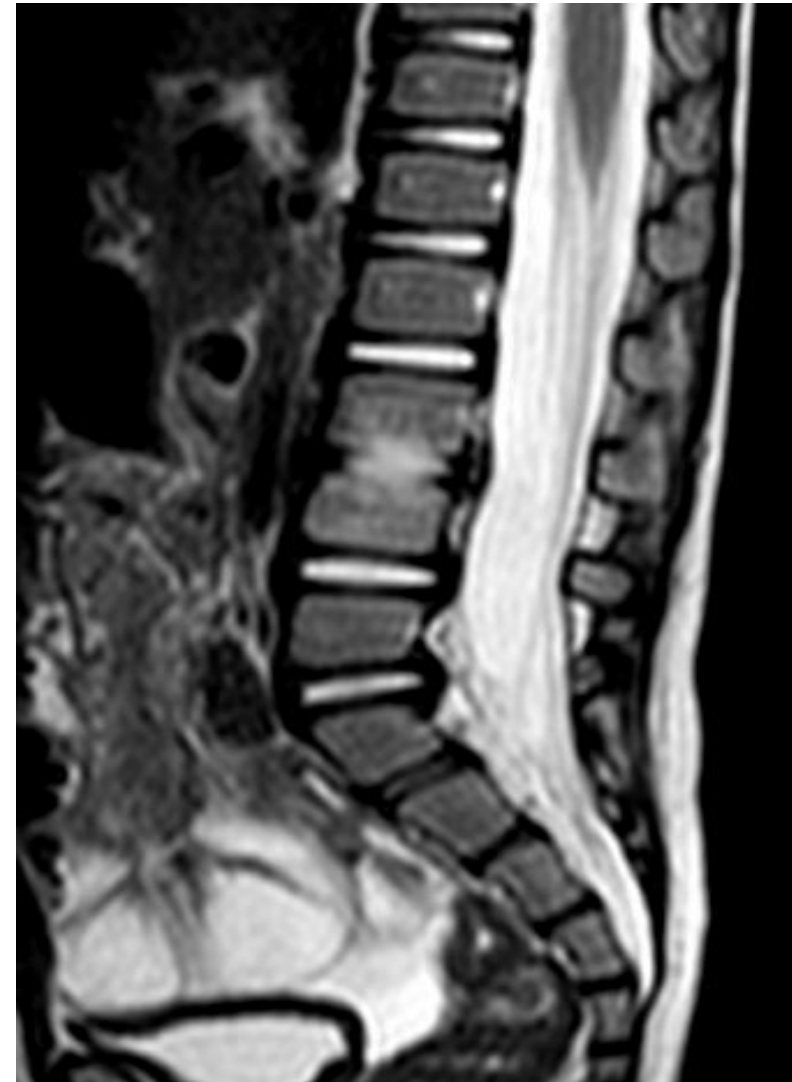
Padre con storia di foruncolosi ricorrente

Presentazione clinica: stipsi, successiva comparsa di zoppia con andatura anserina e rifiuto alla flessione del rachide

Febbre elevata leucocitosi e PCR++

RMN: SPONDILODISCITE L3-L4

RT-PCR: Stafilococco MR PVL +



stafilococco aureo



fattori di virulenza
resistenza agli antibiotici

Fattori di virulenza:

Esotossine

Emolisine α , β , γ

Leucocidine (Panton- Valentine)

Enterotossine

Tossina dello shock tossico (TSS-1)

Tossine pirogene

Esoenzimi

Coagulasi

Stafilochinasi

Ialuronidasi

Proteasi

Enzimi lipolitici

DNAsi

Proteine

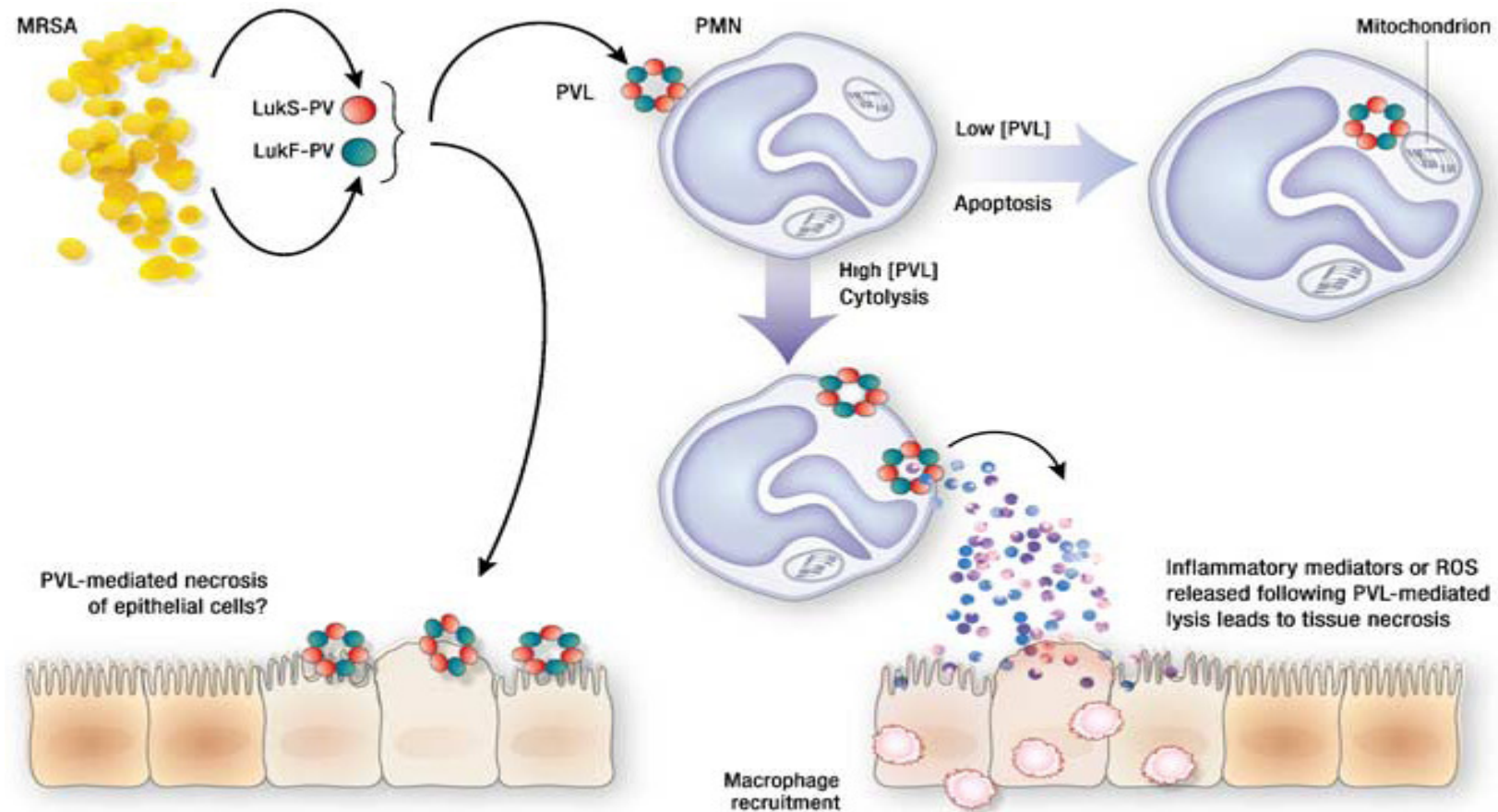
Capsula

Proteina A

Catalasi

Superossido
dismutasi

Fattori di virulenza: Leucocidina di Pantone-Valentine (PVL)



Boyle-Vavra S, Daum R, Laboratory Investigation 2007.

più frequenti negli stafilococchi acquisiti in comunità

stafilococco: la resistenza agli antibiotici e virulenza



acquisiti in comunità



acquisiti in ospedale

assente

pressione selettiva da antibiotici :
acquisizione e scambio di resistenze

forte

vuoto

zainetto contenente elementi genetici mobili

pieno

molto

spazio libero per acquisire fattori di virulenza

poco

Tutti questi bambini hanno infezione da stafilococco aureo PVL+ ,
ma all'anamnesi cosa hanno in comune ?

Martina 2 mesi

fratello adolescente con acne pustolosa

Barbara 4 a

foruncolosi agli arti

Samuele, 19 mesi

padre con storia di foruncolosi ricorrente

La presenza di ***foruncolosi ricorrente*** in famiglia o nel piccolo paziente correla
con la probabilità di una infezione da **Stafilococco Pantone Valentine Positivo**

massimo resti

ANCONA
7 maggio 2016

Sessione sui “cocchi”

Conoscere per combattere: su questo ci giochiamo la partita

Conoscere le strategie dei “cocchi” per farci ammalare
e applicare le strategie degli umani per non farsi
invadere dai “cocchi”

Vaccinandosi e giù per lo stivale

2ª edizione

**... grazie
per la vostra
attenzione**