

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
Facoltà di Medicina e Chirurgia
DOTTORATO DI RICERCA IN DISCIPLINE
MICROBIOLOGICHE
Ciclo XXIII

Dott. CARLO GENOVESE

STUDIO DEI MECCANISMI DI PATOGENICITÀ
DEI BATTERI RESPONSABILI DI
INFEZIONI DELLE VIE URINARIE

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:
Prof. Angelo Castro

Tutor:
Prof.ssa Gianna Tempera

TRIENNIO 2007 – 2010

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	4
---------------------------	---

CAPITOLO 1

L'apparato urinario

1.1 Descrizione.....	6
----------------------	---

CAPITOLO 2

Infezioni delle Vie Urinarie (IVU)

2.1 Generalità.....	10
2.2 Infezioni delle alte e basse vie urinarie.....	11
2.3 Epidemiologia.....	15
2.4 Eziologia.....	18

CAPITOLO 3

Microrganismi responsabili delle Infezioni delle Vie Urinarie

3.1 <i>Acinetobacter spp.</i>	20
3.2 <i>Candida spp.</i>	21
3.3 <i>Citrobacter spp.</i>	22
3.4 <i>Enterococcus spp.</i>	23
3.5 <i>Escherichia coli</i>	25

3.6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
3.7	<i>Proteus mirabilis</i>	27
3.8	<i>Providencia spp.</i>	28
3.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.10	<i>Serratia spp.</i>	30
3.11	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	32

CAPITOLO 4

Terapia antibiotica delle IVU e resistenze batteriche

4.1	Antibiotico-terapia.....	35
4.2	Resistenze batteriche.....	42
4.3	Meccanismi genetici e biochimici di resistenza batterica.....	51
4.4	Considerazioni sulle resistenze batteriche.....	59

CAPITOLO 5

Meccanismi di patogenicità dei batteri uropatogeni

5.1	Patogenicità batterica.....	63
5.2	Adesività batterica: generalità.....	70
5.3	Adesività nelle Infezioni delle Vie Urinarie	72
5.4	Strutture batteriche e adesività.....	78
5.5	UPEC: sierotipi.....	92
5.6	UPEC: secrezione tossine.....	94
5.7	ABU (Asymptomatic Bacteriuria <i>E. coli</i>).....	100
5.8	<i>Escherichia coli</i> e formazione del biofilm.....	102

CAPITOLO 6

Alternative alla terapia antibiotica: “*Vaccinium macrocarpon*”

6.1	Generalità.....	108
6.2	Ipotesi sul meccanismo d’azione.....	110
6.3	Profilo di sicurezza.....	112
6.4	Attività clinica dei derivati.....	113

CAPITOLO 7

Parte Sperimentale

7.1	Scopo dello Studio.....	116
7.2	Materiali e Metodi.....	117
7.3	Risultati.....	139
7.4	Conclusioni.....	143

BIBLIOGRAFIA

▪	<i>Testo</i>	146
▪	<i>Figure</i>	196
▪	<i>Grafici</i>	198
▪	<i>Tabelle</i>	199

INTRODUZIONE

Malgrado la presenza di alcuni disturbi suggestivi, la definizione e, di conseguenza, la diagnosi di Infezione delle Vie Urinarie (IVU) risponde ad un criterio microbiologico: la presenza nelle urine di una carica batterica significativa di microrganismi patogeni. Nella genesi di un'infezione a carico delle vie urinarie, giocano un ruolo importante l'entità della carica batterica, la virulenza del microrganismo ed i meccanismi di difesa dell'ospite, mentre diverse anomalie congenite o acquisite delle vie urinarie influiscono non poco come determinanti di una possibile infezione. Le Infezioni delle Vie Urinarie rappresentano un capitolo importante nell'ambito della Medicina Generale, collocandosi tra le più importanti cause di morbidità, di visita ambulatoriale e di costi sanitari. Appare dunque evidente che l'ottimizzazione delle strategie di antibiotico-terapia per il trattamento di tale stato patologico resta una delle priorità del Medico di Medicina Generale, di concerto col lavoro dei Microbiologi. Il Medico di Medicina Generale viene a confrontarsi, più frequentemente, con infezioni delle basse vie urinarie non complicate, prevalentemente cistiti, che hanno una maggiore incidenza rispetto alle altre tipologie di infezioni urinarie. La

scelta empirica dell'antibiotico non può prescindere da considerazioni di tipo clinico, ma anche dalla probabile eziologia dell'infezione e dalla prevalenza locale di resistenza degli uropatogeni agli antibiotici comunemente utilizzati. Di conseguenza, il successo della terapia empirica sarà più probabile se i dati a disposizione del Medico saranno il più possibile aggiornati ed indicativi della realtà epidemiologica locale. Nella maggioranza dei casi, una terapia antibiotica appropriata è in grado di risolvere l'episodio acuto, mentre scarsi risultati sono ad oggi ottenibili nella prevenzione delle infezioni urinarie ricorrenti, patologie sempre più diffuse specialmente nelle donne. Anche per tale motivo, recentemente, l'attenzione sia di clinici che di microbiologi, è rivolta allo studio dei meccanismi di patogenicità dei batteri uropatogeni (in particolare di *E. coli*) al fine di individuare alternative alla antibiotico-profilassi in donne predisposte ad infezioni urinarie ricorrenti. Di particolare interesse è sicuramente lo studio del principale meccanismo di patogenicità batterica: l'adesività alle cellule uro-epiteliali.

CAPITOLO 1

L'apparato urinario

1.1 Descrizione

L'apparato urinario [Fig.1] svolge l'importante funzione di eliminare i prodotti di rifiuto del catabolismo quali l'urea, l'acido urico, la creatinina e molte sostanze estranee all'organismo (farmaci e tossine). Inoltre, consente la regolazione della concentrazione di numerosi elettroliti, presenti nel fluido extracellulare, e dell'equilibrio acido-base dell'organismo. Esso è costituito dai **reni**, due organi a forma di fagiolo posti retroperinealmente nella cavità addominale, ai lati della colonna vertebrale. Essi sono collegati agli **ureteri**, che hanno il compito di trasportare l'urina alla **vescica** e, da qui, all'esterno attraverso l'**uretra**. Osservando la sezione del rene, si possono distinguere due parti: una parte esterna, chiamata **corticale**; una parte interna, chiamata **midollare**. La zona corticale si presenta di colore rossastro marrone, con aspetto granulare, e contiene i **glomeruli** ed i **tubuli contorti** (proximali e distali). La zona midollare si presenta di colore più chiaro e con striature, dovute alla disposizione parallela delle **anse di Henle**, dei **dotti collettori** e dei vasi sanguigni. La midollare del rene è suddivisa, a

sua volta, in **midollare esterna** (adiacente alla corticale) e **midollare interna**. Il rene è costituito da una dozzina di **lobi**, che sono formati da una piramide di tessuto midollare e da una zona corticale che ne circonda la base ed i lati. La punta della piramide midollare va a costituire la **papilla renale**, che ha il compito di drenare l'urina nel **calice minore**. I calici minori, unendosi, portano alla formazione del **calice maggiore**. Più calici maggiori confluiscono nella **pelvi renale** che, a sua volta, è drenata dall'uretere. L'uretere, l'arteria renale, la vena renale, i nervi ed i vasi linfatici entrano o abbandonano il rene attraverso l'**ileo renale**, costituito da una depressione della superficie mediana.

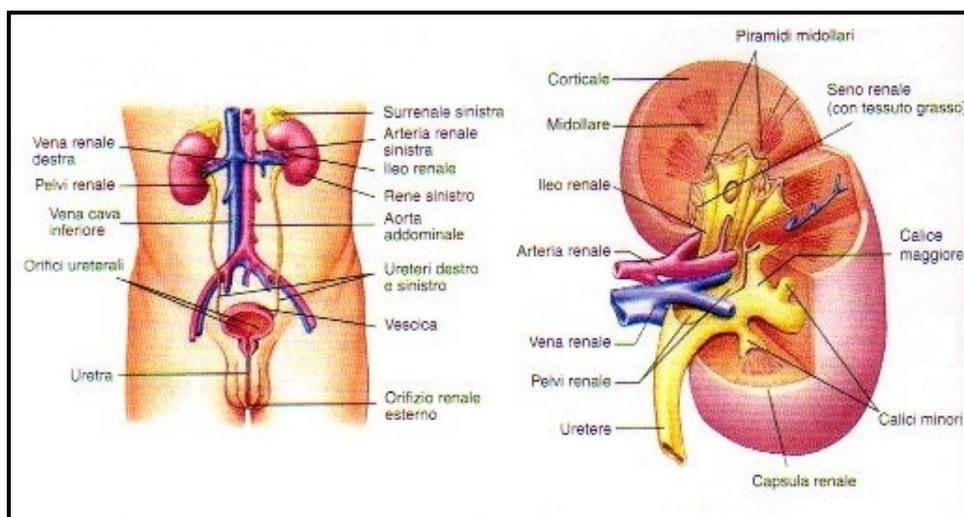


Figura 1 Struttura dell'apparato urinario

Ogni rene umano, nella struttura interna, contiene circa un milione di **nefroni** [Fig. 2] che ne rappresentano le unità strutturali e funzionali. Ogni nefrone consiste in un **glomerulo** col suo **tubulo renale**. Il glomerulo è circondato da una capsula a doppia parete, la **capsula di Bowman**. Lo spazio urinario della capsula di Bowman è continuo con il lume del tubulo renale. Quest'ultimo è suddiviso in diversi segmenti: il **tubulo contorto prossimale**, che si spiralizza attorno al glomerulo, ed il **tubulo retto prossimale**, che si estende verso la zona midollare; l'**ansa di Henle**, che costituisce la porzione compresa tra il tubulo contorto prossimale ed il tubulo contorto distale. La sua parte iniziale costituisce il tubulo retto prossimale che è seguito dal **ramo sottile** e, alla fine, dal **tubulo spesso ascendente**. Questo è a sua volta seguito dal **tubulo contorto distale**. I tubuli contorti distali si uniscono ai **tubuli connettori** che portano ai **dotti collettori corticali**. Questi portano ai dotti collettori della zona midollare esterna. Nella midollare interna i dotti collettori si uniscono per formare dotti via via più grandi che portano l'urina ai calici minori.^[1]

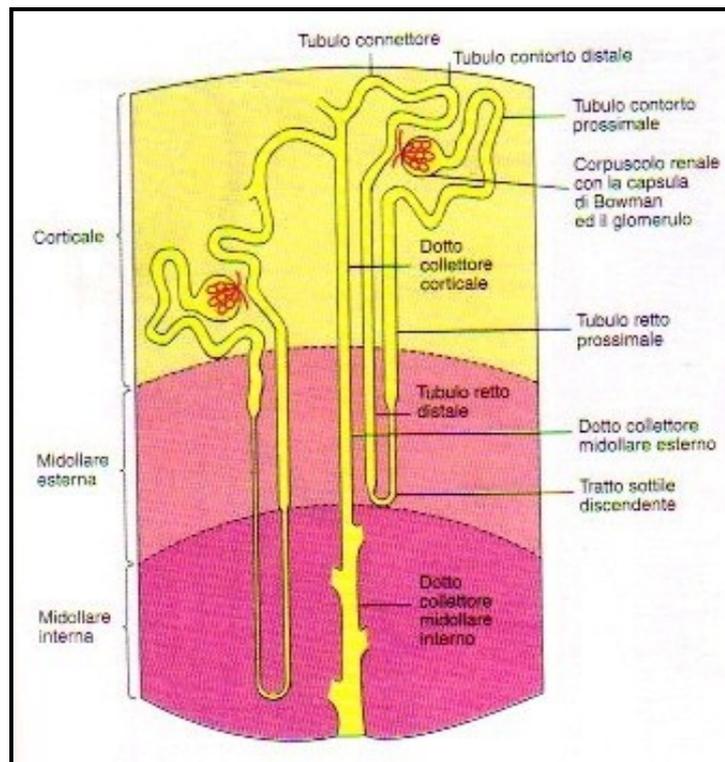


Figura 2 Il nefrone, unità strutturale e funzionale del rene.

CAPITOLO 2

Infezioni delle Vie Urinarie (IVU)

2.1 Generalità

Le infezioni dell'apparato urinario possono essere classificate in due categorie anatomiche: **infezioni delle basse vie** (uretrite, cistite, prostatite) ed **infezioni delle alte vie** (pielonefrite acuta).

Da un punto di vista epidemiologico, si possono ulteriormente suddividere in:

- **IVU non complicate:** cistite, pielonefrite, batteriuria asintomatica (infezioni comunitarie),^[2,3]
- **IVU ricorrenti:** reinfezione con lo stesso o con un altro microrganismo, che compare entro 60 giorni dal primo episodio, indipendente da anomalie anatomiche, funzionali o da danno renale (infezioni comunitarie);
- **IVU complicate:** dipendenti da anomalie anatomiche, cause neurologiche, immunocompromissione o cateterizzazione;
- **IVU nosocomiali:** acquisite in ospedale, che compaiono 72 ore dopo il ricovero e sono spesso correlate alla cateterizzazione.^[4-7]

2.2 Infezioni delle alte e basse vie urinarie

Il termine UTI deriva dall'inglese "*Urinary Tract Infection*" e si riferisce alla presenza di batteriuria, in genere con valore superiore a 10^5 CFU/ml, accompagnata o meno da una sintomatologia specifica per la **cistite**. In genere, con questo termine si indicano le infezioni delle basse vie urinarie che interessano prevalentemente la vescica e l'uretra, a volte anche gli ureteri o la prostata. L'infezione delle basse vie urinarie può essere complicata successivamente da pielonefriti, manifestazioni che riguardano le alte vie urinarie. Da un punto di vista epidemiologico, le cistiti batteriche hanno un'incidenza che varia tra i 5 e i 10 casi ogni 1000 individui rappresentando, quindi, una delle infezioni più frequenti nell'uomo. La frequenza delle cistiti tende ad aumentare con l'età ed è, inoltre, influenzata da diversi fattori:

- alterazioni funzionali o anatomiche delle vie urinarie;
- malformazioni congenite;
- malattie della prostata;
- esiti chirurgici sulla vescica;
- incontinenza urinaria;
- cateterismo vescicale;

- ostacolato deflusso urinario;
- presenza di calcoli vescicali;
- diabete;
- sindrome da immunodeficienza acquisita;
- lesioni a livello del midollo spinale.

In alcuni casi, anche la gravidanza può rappresentare uno dei fattori di rischio. La maggior parte delle infezioni vescicali è sostenuta da germi Gram-negativi (circa il 90% di tutte le infezioni) con una netta prevalenza di germi di provenienza fecale. Più della metà delle infezioni è causata da *Escherichia coli* seguito, in quanto a frequenza, da *Enterococcus faecalis* e da altri ceppi batterici quali *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. La sintomatologia della cistite include disuria, intesa come dolore o bruciore minzionale, incremento della frequenza urinaria, torbidità, a volte particolare odore delle urine, saltuaria nicturia, ematuria e piuria. Nell'uomo può essere associata a minzione intermittente, sgocciolamento tardivo e/o sintomi ostruttivi nel caso di estensione dell'infezione al tessuto prostatico. In alcuni casi la cistite può essere asintomatica, presentando solo una batteriuria rilevata con metodica strumentale (urinocoltura); in altri casi può essere associata anche

a sintomi sistemici tra cui febbre, anche superiore ai 38-39°C, e dolore pelvico aspecifico. Una delle complicazioni più frequenti è rappresentata dalla pielonefrite, che può assumere aspetti particolarmente gravi negli anziani, negli infanti e nei pazienti immuno-compromessi. Le infezioni delle basse vie urinarie hanno un tasso di ricorrenza di circa il 20%, dopo adeguata terapia antibiotica. In alcuni casi, le ricorrenze assumono frequenze molto elevate, specialmente nelle donne in menopausa, favorite dalla presenza di un'uretra naturalmente corta e dalle modificazioni del microambiente vulvo-vaginale determinate dal calo estrogenico.^[8-10]

L'**uretrite**, nel caso delle donne, è caratterizzata da pollachiuria e disuria; negli uomini, generalmente, si manifesta disuria ma non pollachiuria.

L'**uretrite non specifica** nei maschi decorre con secrezione uretrale e/o disuria. La **sindrome uretrale acuta** nelle donne, in genere, viene erroneamente diagnosticata come cistite. Nel corso di tale condizione patologica, le pazienti lamentano disuria e pollachiuria, ma le loro urinocolture iniziali sono sterili o danno luogo allo sviluppo di un ridotto numero di batteri.^[11]

Le infezioni delle alte vie urinarie prendono il nome di **pielonefriti**. Quest'ultime possono essere distinte in acute e croniche. Le **pielonefriti**

acute si manifestano con febbre elevata, brividi e dolore a livello renale, accompagnati da disturbi della minzione. I batteri più frequentemente riscontrati sono *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprofiticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e, nel caso di pazienti immunodepressi, *Providencia stuartii*. I fattori che predispongono all'insorgenza delle pielonefriti acute sono le manovre invasive a livello genito-urinario, eventuali anomalie urologiche anatomico-funzionali, gravidanza ed immunodepressione. A seguito di ostruzione delle vie urinarie, calcolosi o reflusso vescico-uretrale si può sviluppare la **pielonefrite cronica**.

La profilassi a lungo termine appare inutile se non si procede alla rimozione delle cause dell'infezione, ad esempio facendo ricorso ad un intervento chirurgico che consenta il ripristino del flusso urinario. Ciò consentirebbe all'antibiotico di raggiungere la sede dell'infezione ed una concentrazione utile nell'urina.^[12]

2.3 Epidemiologia

Le Infezioni delle Vie Urinarie (IVU) rappresentano, dopo quelle respiratorie, le patologie infettive di più frequente riscontro in ambito comunitario. Negli Stati Uniti, le IVU acquisite in comunità sono responsabili ogni anno di circa 7 milioni di visite, in genere attribuibili ad infezioni non complicate delle basse vie (cistiti).^[13] A fronte di tali cifre, circa il 15% di tutti gli antibiotici prescritti dai *Family Doctors* è riservata proprio al trattamento in ambito comunitario delle IVU non complicate, per una spesa annuale media valutata in oltre 1 miliardo di dollari.^[14] Anche le infezioni urinarie comunitarie gravi rivestono un ruolo epidemiologico importante, con più di 100.000 ricoveri ospedalieri annui.^[15] Le IVU acquisite in ambito nosocomiale sono, invece, le patologie di più frequente osservazione, con un'incidenza pari al 40% rispetto a tutte le infezioni nosocomiali.^[16] Una batteriuria si sviluppa all'incirca nel 25% dei pazienti ospedalizzati e cateterizzati per oltre 7 giorni, comportando un aumento medio del costo diretto dell'ospedalizzazione pari a 500-1.000 dollari.^[17] L'impatto finanziario, dovuto all'elevata incidenza delle IVU in Italia, risulta essere importante: da uno studio effettuato con 120 urologi risulta che il 40% del loro tempo di lavoro in un anno è dedicato esclusivamente a

visite per infezioni urinarie. Vanno inoltre considerati tutti i costi dovuti alle prescrizioni, alle spese per visite domiciliari, alle ospedalizzazioni e tutti quei costi non strettamente legati al sistema sanitario, ad esempio i giorni di malattia.^[18] Le infezioni urinarie rientrano tra le più comuni forme infettive di origine batterica che interessano l'uomo. Da ciò si deduce l'elevata frequenza con cui viene richiesta consulenza specialistica, nefrologica o urologica, o addirittura il ricovero ospedaliero. Esse interessano entrambi i sessi e tutte le fasce di età, sebbene con diversa incidenza. L'1% dei neonati presenta batteriuria con un'incidenza da 2 a 4 volte superiore per i maschi, probabilmente a causa della maggiore frequenza di anomalie congenite all'apparato uro-genitale. Inoltre, nei bambini prematuri si riscontra un incremento della batteriuria 4 volte superiore rispetto ai bambini nati a termine (2,9% vs 0,7%). Nell'infanzia, fino ai 10 anni di età, l'incidenza delle Infezioni delle Vie Urinarie nelle bambine è di circa l'1,2%, di cui un terzo sintomatiche, e nei bambini la frequenza della batteriuria si attesta tra 0,04% e 0,14%. In maniera approssimativa l'1-3% delle donne comprese tra i 15 ed i 24 anni, in coincidenza con l'inizio dell'attività sessuale, presenta batteriuria; l'incidenza aumenta dall'1% al 2% per ciascuna decade successiva fino a raggiungere il 10% nel periodo di età compresa tra i 60 ed

i 70 anni. Il 6% di tale gruppo è spesso sintomatico. Nei maschi, a causa dell'invecchiamento e della maggiore frequenza di patologie prostatiche, l'incidenza delle IVU aumenta in modo significativo, raggiungendo il 3,5% nella popolazione generale con picchi del 15% nei ricoverati [Graf. 1]. Inoltre, esistono gruppi di pazienti a rischio in cui la probabilità di sviluppare un'infezione urinaria è molto elevata. Di conseguenza, anche dal punto di vista economico, tale patologia viene ad assumere un significato di notevole importanza.^[19]

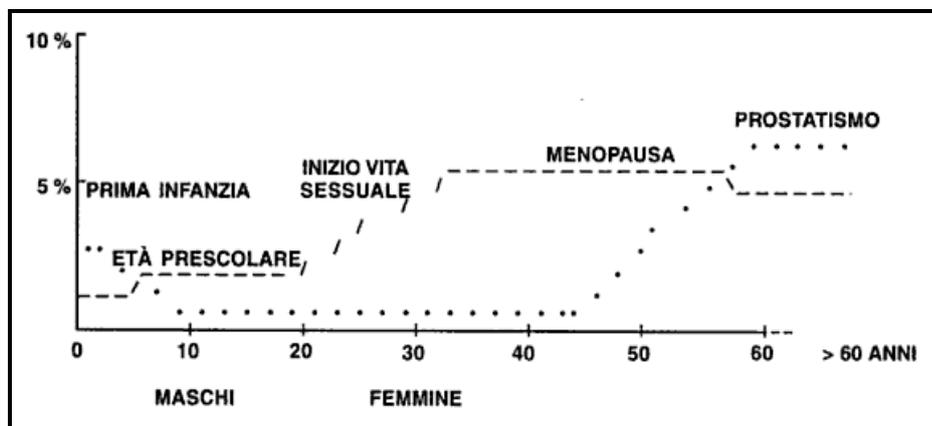


Grafico 1 Incidenza delle IVU

2.4 Eziologia

I microrganismi possono raggiungere le vie urinarie per via ematogena, linfatica o per via retrograda, ma le evidenze cliniche e sperimentali indicano in quest'ultima, cioè nell'ascesa dei microrganismi dall'uretra, la via più comune attraverso la quale si stabilisce una IVU, soprattutto per quanto riguarda i microrganismi di origine enterica (*Escherichia coli* ed altre *Enterobacteriaceae*). In accordo con quanto proposto dall'*European Association of Urology*, le infezioni urinarie possono essere classificate in non complicate (cistiti), complicate (pielonefrite, urosepsi) e forme speciali (prostatite, epididimite e orchite).^[20] *Escherichia coli* è senza dubbio il microrganismo più frequentemente isolato nelle infezioni urinarie, quanto meno in assenza di fattori di rischio concomitanti (cistiti e pielonefrite non complicate), in percentuali pari al 75-90%, con talune differenze in funzione dei diversi studi e delle diverse realtà geografiche. Seguono poi altre specie batteriche quali *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., ed *Enterococcus* spp.. In ambito nosocomiale, o nelle infezioni complicate, l'incidenza di infezioni sostenute da *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Pseudomonas*, ma anche da *Enterococcus faecalis* e da alcune specie fungine, subisce un netto

incremento, ridimensionando il ruolo patogeno di *E. coli*.^[21] Nei soggetti anziani con IVU, benché *E. coli* continui ad essere il microrganismo di più frequente isolamento, altre specie batteriche sono individuate con frequenza maggiore rispetto ad altri gruppi di soggetti. Così, ad esempio, sono isolati altri enterobatteri, tra cui *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Morganella morganii*. Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS), Streptococchi di gruppo B, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e, occasionalmente, *Candida* spp. concorrono anch'essi all'eziologia delle IVU nell'anziano. Lo spettro delle specie microbiche isolate dalle IVU nei pazienti più anziani differisce in funzione dell'ambito di appartenenza dei soggetti, ovvero comunità, case di cura per lungodegenti o ospedali.^[22]

CAPITOLO 3

Microrganismi responsabili delle Infezioni delle Vie Urinarie

3.1 *Acinetobacter spp.*

Acinetobacter è un batterio Gram-negativo, non-fermentante, ubiquitario che si ritrova nell'ambiente, in diversi alimenti e sulla cute umana. Delle 20 specie identificate nel corso degli ultimi anni nell'uomo, si ritrovano soprattutto *Acinetobacter iwoffii*, *A. johnsonii* e *A. radioresistens*. La specie più importante responsabile di infezioni a livello nosocomiale è *A. baumannii*, conosciuto inizialmente come *A. calcoaceticus* var. *anitratus*. Si stima che fino al 25% della popolazione è portatrice di *Acinetobacter spp.* a livello della flora cutanea, in modo particolare a livello delle ascelle, nella regione inguinale e negli spazi interdigitali, sebbene la percentuale di portatori sia maggiore nei pazienti ospedalizzati. Le più gravi infezioni ospedaliere dovute ad *Acinetobacter spp.* sono le infezioni delle vie respiratorie, le batteriemie e le meningiti secondarie^[23], mentre le batteriemie si riscontrano più frequentemente in pazienti immunocompromessi. Una particolare attenzione merita l'antibiotico-resistenza di *Acinetobacter spp.*, che si manifesta sotto forma di multiresistenza dovuta

alla produzione di β -lattamasi e di enzimi attivi sugli aminoglicosidi^[24].

L'attività dei nuovi antibiotici a largo spettro, quali le cefalosporine di terza generazione ed i fluorochinoloni, resta ancora oggi conservata sebbene diminuita nel corso di questi ultimi anni. I più attivi su tali specie batteriche restano i carbapenemi. Sono stati, comunque, già descritti ceppi capaci di idrolizzare l'*imipenem* rendendolo inefficace.^[25]

3.2 *Candida spp.*

Alcune specie del genere *Candida* sono abituali commensali della cute, delle mucose e delle cavità naturali dell'uomo. *Candida* è un microrganismo dimorfico, cioè che presenta una spiccata adattabilità nei confronti dell'ambiente nel quale si riproduce ed è in grado manifestarsi in forme diverse. In condizioni di temperatura moderata, basso pH e in assenza di induttori, quali siero o N-acetil-glucosamina, le cellule crescono in forma di lieviti;^[26] l'incremento della temperatura e del pH e l'aggiunta di induttori stimolano invece la crescita filamentosa, con la formazione di pseudoife o vere e proprie ife.^[27] Le due forme sono antigenicamente e chimicamente diverse e quella filamentosa, dotata di capacità invasiva, è quella ritenuta responsabile dell'azione patogena. Alla patogenicità di tale specie

contribuiscono diversi meccanismi di virulenza che includono:

- la capacità di aderire selettivamente a vari epitelii mucosi, grazie all'azione di adesine specifiche;
- la produzione di proteinasi;
- la formazione di ife e pseudoife;
- la produzione di fosfolipasi.

Candida albicans è la specie che presenta la maggiore capacità di adesione agli epitelii mucosi, che penetra attivamente con l'aiuto di esoenzimi, provocando la lisi delle cellule ospiti. Inoltre, *C. albicans* è in grado di rilasciare differenti tipi di tossine che possono essere immesse in circolo raggiungendo organi ed apparati diversi. *C. albicans* è la specie più frequentemente isolata dai casi clinici, seguita da *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, quest'ultima di riconosciuta patogenicità ma di sporadico riscontro.^[28-30]

3.3 *Citrobacter spp.*

I microrganismi appartenenti al genere *Citrobacter* sono bacilli Gram-negativi, aerobi, che si ritrovano comunemente nel suolo, nelle acque, nel cibo e nel tratto intestinale sia dell'uomo che degli animali. Questi batteri

causano una grande varietà di infezioni a livello del tratto urinario, intestinale e respiratorio.^[31] Il genere *Citrobacter* comprende 11 specie diverse, delle quali *C. freundii* e *C. diversus* sono quelle più significative e responsabili di infezioni opportunistiche nosocomiali. *Citrobacter* è stato frequentemente associato a batteriemie polimicrobiche.^[32] L'alta incidenza di mortalità, a seguito di infezioni da parte di questi microrganismi, è stata associata a ceppi multiresistenti agli antibiotici.^[33]

3.4 *Enterococcus spp.*

Il genere *Enterococcus* comprende cocchi Gram-positivi, anaerobi facoltativi, asporigeni, non dotati di organi di motilità. Sono state identificate almeno 18 specie: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. sulfureus*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar* e, recentemente, *E. asini sp. nov.*^[34] Sebbene il tratto intestinale costituisca l'habitat preferito, gli enterococchi sono anche presenti nel suolo e nelle acque di superficie.^[35] Gli enterococchi, in passato, erano considerati non patogeni, ma negli ultimi decenni sono emersi sempre più come patogeni opportunisti in pazienti

ospedalizzati e immuno-compromessi. Attualmente sono tra gli organismi di più frequente isolamento in ambito nosocomiale. Le principali infezioni causate da *E. faecium* ed *E. faecalis* sono: infezioni del tratto urinario, soprattutto in pazienti portatori di catetere; batteriemie, endocarditi e meningiti, specialmente in pazienti immuno-compromessi. L'ampio spettro di resistenza nei confronti di numerosi farmaci antibatterici pone rilevanti problemi alla terapia delle infezioni sostenute da tali microrganismi. Quasi tutti i ceppi di *E. faecalis* producono, infatti, β -lattamasi che conferiscono un'elevata resistenza contro *imipenem* e tutte le penicilline, ad eccezione di quelle combinate con inibitori delle β -lattamasi.^[36] Gli enterococchi mostrano, inoltre, una marcata abilità nell'acquisire materiale genetico capace di conferire resistenza agli antibiotici, tanto che la loro resistenza ai glicopeptidi ha comportato la crescente diffusione di enterococchi *vancomicina*-resistenti.^[37] Nonostante la loro crescente importanza clinica, i meccanismi patogenetici degli enterococchi non sono stati ancora del tutto compresi. Studi su *E. faecium* hanno evidenziato che la resistenza antibiotica gioca un ruolo importante nella patogenesi delle infezioni enterococciche. Per quanto riguarda *E. faecalis*, il più importante fattore di virulenza identificato sembra essere la citolisina, attiva contro una vasta

gamma di cellule sia procariotiche che eucariotiche. Tra gli altri fattori di virulenza studiati, che contribuiscono all'abilità di questi batteri di adattarsi a diverse condizioni ambientali nonché di causare infezioni, si ricordano: gelatinasi, proteasi e sostanza di aggregazione.^[38]

3.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli rappresenta il microrganismo aerobio/anaerobio facoltativo predominante della flora batterica residente del tratto intestinale umano, sebbene alcuni ceppi possano esprimere fattori di patogenicità capaci di provocare, in alcune condizioni, quadri patologici anche gravi. Gli stipiti virulenti riescono a colonizzare gli epiteli sia dell'apparato intestinale che uro-genitale, con produzione di tossine. *Escherichia coli* è l'agente eziologico più importante e frequente di Infezioni delle Vie Urinarie, essendo isolato nel 50-85% dei pazienti, in particolare di sesso femminile. Tali infezioni sembrano essere sostenute da particolari sierotipi, la cui configurazione antigenica riflette la presenza di specifiche adesine, le fimbrie P (PAP: Pyelonephritis-Associated-Pili), che consentono l'adesione del batterio alla superficie delle cellule mucose delle vie urinarie, dando così inizio al processo infettivo. Recenti studi *in vitro* hanno anche dimostrato

che l'adesione non specifica del batterio sull'epitelio della vescica è mediata dall'acido sialico.^[39-42]

3.6 *Klebsiella pneumoniae*

Le Klebsielle sono batteri, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, anaerobi facoltativi, provvisti di capsula ma che non presentano organi di motilità. Sono frequentemente isolate da materiale fecale umano e spesso associate a forme morbose che interessano l'apparato respiratorio. La specie più importante è *Klebsiella pneumoniae*: si tratta di un comune commensale delle prime vie respiratorie dell'uomo.

K. pneumoniae è riconosciuta anche come importante agente eziologico delle infezioni del tratto urinario e di setticemie in individui immunocompromessi. La maggior parte dei ceppi da isolamento clinico di *Klebsiella pneumoniae* presenta una capsula polisaccaridica che riveste l'intera superficie del batterio e che, generalmente, è considerata un importante fattore di virulenza. Infatti, diversi studi *in vitro* hanno dimostrato come essa giochi un ruolo importante nella protezione contro i processi di fagocitosi.^[43]

3.7 *Proteus mirabilis*

I batteri del genere *Proteus* sono Gram-negativi, anaerobi facoltativi, che si ritrovano normalmente nel suolo e nella flora intestinale dell'uomo. *Proteus mirabilis* è una specie batterica non in grado di produrre di indolo, responsabile della maggior parte delle infezioni umane e rappresenta, dopo *Escherichia coli*, il più frequente agente eziologico di infezioni delle vie urinarie, soprattutto in pazienti cateterizzati e con anomalie dell'apparato uro-genitale.^[44]

Nonostante i meccanismi di patogenicità non siano stati ancora oggi del tutto chiariti, sono stati comunque descritti svariati fattori di virulenza che includono: produzione di ureasi,^[45,46] adesione all'epitelio del tratto urinario,^[47] produzione di emolisina, "swarming", invasività, produzione di enzimi proteolitici responsabili del cleavage delle immunoglobuline IgG e IgA e proteine della membrana esterna (OMP). La produzione di ureasi e la conseguente alcalinizzazione dell'urina, dovuta alla produzione di ammoniaca, contribuiscono ad un incremento della gravità dell'infezione, portando al danneggiamento dell'epitelio renale e dando luogo alla possibile formazione di calcoli renali, dovuti alla precipitazione di sali di calcio e di magnesio.^[48-52]

3.8 *Providencia* spp.

Il genere *Providencia* comprende microrganismi patogeni Gram-negativi. Si conoscono, in particolare, 5 specie: *Providencia alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, e *P. stuartii*. Questi batteri, non in grado di fermentare il lattosio, sono noti come agenti eziologici di Infezioni delle Vie Urinarie ma, soprattutto, come potenziali responsabili di superinfezioni nelle ustioni cutanee. Le infezioni da *Providencia* sono spesso difficili da trattare, a causa della loro insensibilità nei confronti di un gran numero di farmaci antibatterici.^[53]

3.9 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa è un bacillo Gram-negativo, asporigeno, aerobio obbligato, non-fermentante e ossidante che appartiene al genere *Pseudomonas*. Quest'ultimo comprende numerose specie comunemente presenti nel suolo, nelle acque e negli ambienti umidi, alcune delle quali interessano la patologia umana. *P. aeruginosa* è solitamente mobile per la presenza di un flagello polare, sebbene siano stati identificati ceppi con più flagelli o privi di motilità. Il batterio si caratterizza per la produzione di pioverdina e di piocianina, un pigmento fenazinico di colore blu, idrosolubile ma non fluorescente, che impartisce alle colonie tale colore. La specie presenta modeste esigenze nutrizionali ed è capace di metabolizzare una grande varietà di sorgenti di carbonio. L'opportunismo di *P. aeruginosa* è in relazione alla diminuzione delle difese umorali e cellulari dell'ospite debilitato o immuno-compromesso, ed è responsabile dell'insorgenza di infezioni negli ustionati, infezioni urinarie, otiti, endocarditi, polmoniti, batteriemie, ecc. Alla virulenza di *P. aeruginosa* contribuisce un'ampia varietà di meccanismi: espressione di adesine, produzione di biofilm, secrezione di enzimi idrolitici e rilascio di tossine.^[54] Le infezioni da *P. aeruginosa* sono spesso difficili da trattare, poiché il batterio presenta

un'elevata resistenza a molti degli antibiotici comunemente utilizzati, ma è solitamente sensibile ad alcune penicilline sintetiche, *carbenicillina* e *ticarcillina*, alle nuove cefalosporine, *cefotaxime* e *ceftriaxone*, a molti aminoglicosidi, quali *gentamicina* e *tobramicina*, e alla *polimixina B*.^[55]

3.10 *Serratia* spp.

I batteri del genere *Serratia* si ritrovano più frequentemente nel suolo che non in campioni clinici. In particolare, *Serratia marcescens* fu identificata nel 1823 da Bartolomeo Bizio come la causa del “miracolo della polenta sanguinante” che risultò essere soltanto polenta contaminata da *Serratia* le cui colonie, mucose e pigmentate in rosso vivo, simulano l'aspetto di gocce di sangue coagulato. Il genere *Serratia* comprende sei specie, di cui tre isolabili dall'uomo: *S. marcescens*, *S. liquefaciens* e *S. rubidae*. *Serratia marcescens* è un tipico patogeno opportunisto, che può venire isolato da numerose infezioni a sede extra-intestinale e che, in ambito ospedaliero, può dar luogo anche a focolai epidemici coinvolgenti numerosi pazienti. Le infezioni da *S. marcescens* sono spesso assai gravi, sia perché coinvolgono di norma pazienti debilitati sia per la scarsa sensibilità del batterio a numerosi antibiotici.^[56]

3.11 *Staphylococcus aureus*

Gli stafilococchi sono batteri Gram-positivi, di forma rotondeggiante, con diametro di circa 1 μm , che duplicandosi assumono la caratteristica disposizione a grappolo dovuta alla modalità di divisione cellulare che avviene secondo tre piani perpendicolari. Si tratta di aerobi asporigeni, privi di motilità, che crescono bene nei comuni terreni di coltura ma sono inibiti da terreni che contengono cristalvioletto; catalasi-positivi, fermentano i carboidrati e producono pigmenti dal bianco al giallo intenso. Il genere *Staphylococcus* comprende circa 30 specie. *S. aureus* si distingue dalle altre specie per la produzione di coagulasi, la fermentazione del mannitolo e la produzione, in terreno solido, di un pigmento giallo-oro da cui prende il nome. È diffuso negli animali e nell'uomo e, quest'ultimo, spesso ne è portatore sano sulla cute e a livello del naso-faringe. Tra gli stafilococchi coagulasi-negativi, *S. epidermidis* è uno dei microrganismi predominanti della flora batterica della cute ed è normalmente presente sulle mucose degli apparati respiratorio e gastrointestinale, sia nell'uomo che negli animali. La virulenza degli stafilococchi, in particolare *S. aureus* e *S. epidermidis*, è multifattoriale ed è mediata dall'azione patogena di esotossine, esoenzimi, componenti strutturali e metabolici batterici vari. Le infezioni

stafilococciche sono alla base di quadri patologici diversi, che si differenziano notevolmente a seconda della sede del processo infettivo e delle sue modalità di diffusione (per contiguità, diffusione metastatica ematogena, ecc.).^[57]

3.12 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia è un batterio Gram-negativo, aerobio, asporigeno, di dimensioni da 0,5 a 1,5 µm, dotato di motilità dovuta alla presenza di flagelli polari. Il genere *Stenotrophomonas* include attualmente due specie: *S. maltophilia* e *S. africana*. Quest'ultima è biochimicamente identica alla precedente, tranne che per la non assimilazione del cisaconitato. *S. maltophilia* è generalmente considerato un batterio opportunisto. Ubiquitario nell'ambiente (acqua, suolo, animali e piante) e presente a livello della flora commensale dell'uomo questo microrganismo, nutrizionalmente poco esigente, può anche essere isolato in macchine per la fabbricazione del ghiaccio, apparecchi ospedalieri, umidificatori, liquidi per emodialisi, soluzioni parenterali e addirittura soluzioni antisettiche, quali la *clorexidina* o *l'ammonio quaternario*. La trasmissione di tale batterio ai pazienti può avvenire sia direttamente, a partire dalle sorgenti sopra

descritte, sia tramite le mani contaminate degli operatori sanitari, con conseguente colonizzazione dell'epidermide (ulcere cutanee) o delle mucose (infezioni tracheobronchiali) o, talora, diffusione per via ematica (batteriemie). I fattori ed i meccanismi di virulenza di *S. maltophilia* non sono stati ancora del tutto chiariti. Studi nei quali l'infezione da *S. maltophilia* non era correlata ad una significativa morbilità o mortalità, o altri in cui la stessa non era considerata possibile se non in associazione ad altre specie batteriche, ha creato una certa confusione tra fenomeni di colonizzazione e processi infettivi veri e propri. Finora è stata comunque evidenziata la presenza di enzimi extracellulari quali DNasi, RNasi, fibrinolisinasi, lipasi, ialuronidasi, proteasi ed elastasi, che svolgono presumibilmente un ruolo nella patogenicità di *S. maltophilia*. D'altronde, la sua capacità di adesione al vetro, così come ai polimeri, potrebbe in parte spiegare il motivo per cui *S. maltophilia* venga frequentemente isolato in pazienti portatori di dispositivi medici impiantabili.^[58] La resistenza di questo microrganismo a numerosi antibiotici è dovuta a diversi fattori. *S. maltophilia* dispone di due β -lattamasi cromosomiali inducibili, L1 ed L2.^[59] L1 è in grado di idrolizzare l'*imipenem*, così come altri carbapenemici, ma anche l'*ampicillina*, la *carbenicillina* ed il *cefotaxime*;

non è sensibile all'*acido clavulanico*, ma lo è debolmente ad altri inibitori quali il *subactam* o il *tazobactam*^[58], spiegandosi così la resistenza naturale di *S. maltophilia* a questi antibiotici. L2 è nettamente meno efficace nei confronti delle penicilline, ma idrolizza molto bene l'*aztreonam* ed è anche sensibile all'*acido clavulanico*. Inoltre, la membrana esterna di *S. maltophilia* è assai poco permeabile agli antibiotici.^[59]

CAPITOLO 4

Terapia antibiotica delle IVU e resistenze batteriche

4.1 Antibiotico-terapia

I criteri generali per l'utilizzo di un antibiotico nel trattamento delle infezioni del tratto genito-urinario sono essenzialmente influenzati da diversi fattori, in particolare: **spettro antimicrobico**, che dovrebbe coprire la maggior parte dei ceppi patogeni causa di infezione; **caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche**, tali da consentire una concentrazione adeguata dall'antibiotico nelle urine e la sua diffusione nei tessuti genito-urinari; **sicurezza, tollerabilità, comodità d'uso e costo contenuto**. Lo studio osservazionale ICeA (Indagine sulle Cistiti e Antibiotici), offre una chiara panoramica sui microrganismi responsabili di IVU ambulatoriali in Italia [Graf. 2]. Il germe che si isola con maggiore frequenza è *Escherichia coli*, sia nelle forme non complicate sia in quelle complicate, sebbene in quest'ultime si riscontri sempre più la presenza di *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Ulteriore criterio adottabile ai fini di una terapia appropriata e mirata viene fornito dall'adeguatezza dei dosaggi somministrati, non solo in termini

quantitativi ma anche temporali, vale a dire l'intervallo tra le dosi e la durata totale della terapia.

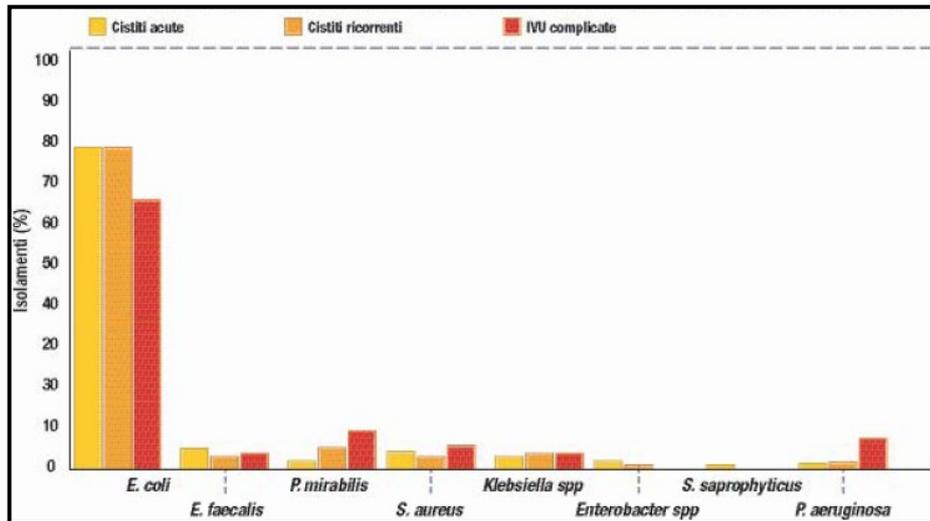


Grafico 2 Microrganismi responsabili di IVU ambulatoriali (Studio ICeA)

Per quanto riguarda la durata della terapia, ormai la maggior parte delle linee guida concorda nell'indicare in tre giorni la durata ottimale del trattamento nelle IVU non complicate, facendo ricorso all'uso di farmaci di prima scelta (*cotrimossazolo* e *ciprofloxacina*). Trattamenti di durata superiore, infatti, non offrono significativi vantaggi. Se un antibiotico viene utilizzato con dosaggi appropriati e con un giusto intervallo tra le dosi, si raggiunge un altro obiettivo importante della terapia, ovvero quello di limitare la selezione di ceppi batterici resistenti. Il problema delle resistenze

agli antibiotici rappresenta una vera e propria emergenza, in quanto tali farmaci sono gli unici in grado di condizionare l'esito dell'intervento terapeutico e l'intero ecosistema. Per valutare la propensione che ciascun antibatterico possiede nella selezione della resistenza, si può tenere in considerazione il rapporto tra AUC (la quantità di farmaco che si distribuisce nell'organismo in funzione del tempo) e MIC (concentrazione minima di antibiotico che inibisce la crescita batterica). Tale rapporto viene detto AUIC [Graf. 3], che è altamente predittivo di eradicazione del microrganismo patogeno. Per i fluorochinoloni deve raggiungere almeno un valore di 125 per essere efficace.^[60,61] I fluorochinoloni orali sono generalmente indicati in prima istanza nel trattamento delle infezioni acute delle basse vie urinarie e nelle pielonefriti acute non complicate, insieme al *cotrimossazolo*. Va specificato che i fluorochinoloni citati nelle linee guida internazionali sono *ciprofloxacina*, *norfloxacina*, *levofloxacina* e *ofloxacina*. Tutte le linee guida pongono l'attenzione sul problema delle resistenze al *cotrimossazolo* e ne sconsigliano l'utilizzo ove l'epidemiologia locale dimostri una percentuale di resistenza di *Escherichia coli* compresa tra il 10 ed il 20%. Le alternative proposte sono rappresentate da *nitrofurantoina* e *fosfomicina-trometamolo*.

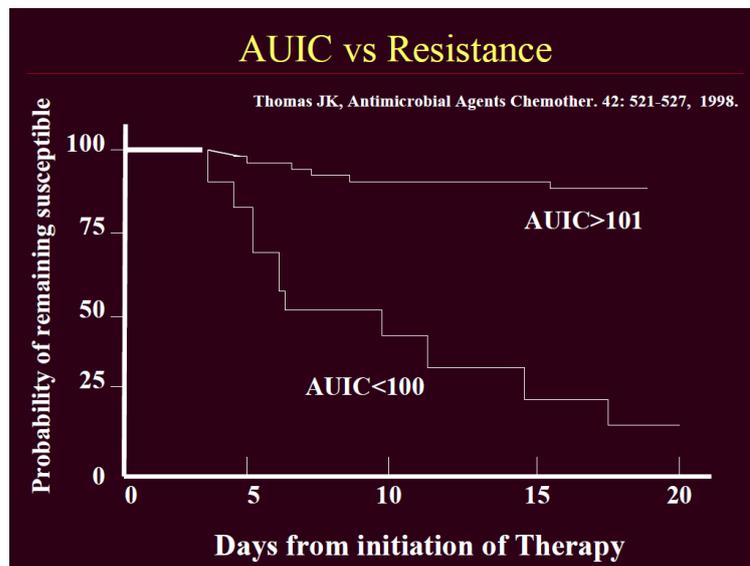


Grafico 3 AUC (Area Under the Inhibitory Curve)

Per entrambi, si osservano fenomeni di resistenza specialmente tra uropatogeni quali *Klebsiella* e *Proteus*. La *nitrofurantoina* va usata per sette giorni e presenta effetti collaterali frequenti a carico del tratto gastro-intestinale. La *fosfomicina* viene utilizzata in monosomministrazione ed è più costosa degli altri farmaci.^[62-64] I fluorochinoloni sono controindicati in gravidanza, in allattamento ed in età pediatrica. E' evidente come, nel caso di infezioni acute non complicate nel sesso femminile, sia molto importante la scelta della terapia antibiotica empirica ragionata [Fig. 3].^[65] Ciò corrisponde, peraltro, al comportamento abituale dei Medici di Medicina Generale italiani, come risulta anche dallo studio ICeA. Tale studio

osservazionale, effettuato nel corso del 2001 da parte di 105 Medici di Medicina Generale italiani, riflette tra le altre cose le loro abitudini prescrittive ed è stato oggetto di numerose valutazioni ed osservazioni critiche. Oggi possiamo valutarlo anche alla luce delle diverse linee guida per il trattamento delle IVU successivamente pubblicate, quali le IDSA^[62] e le EAU [Tab. 1].^[63]

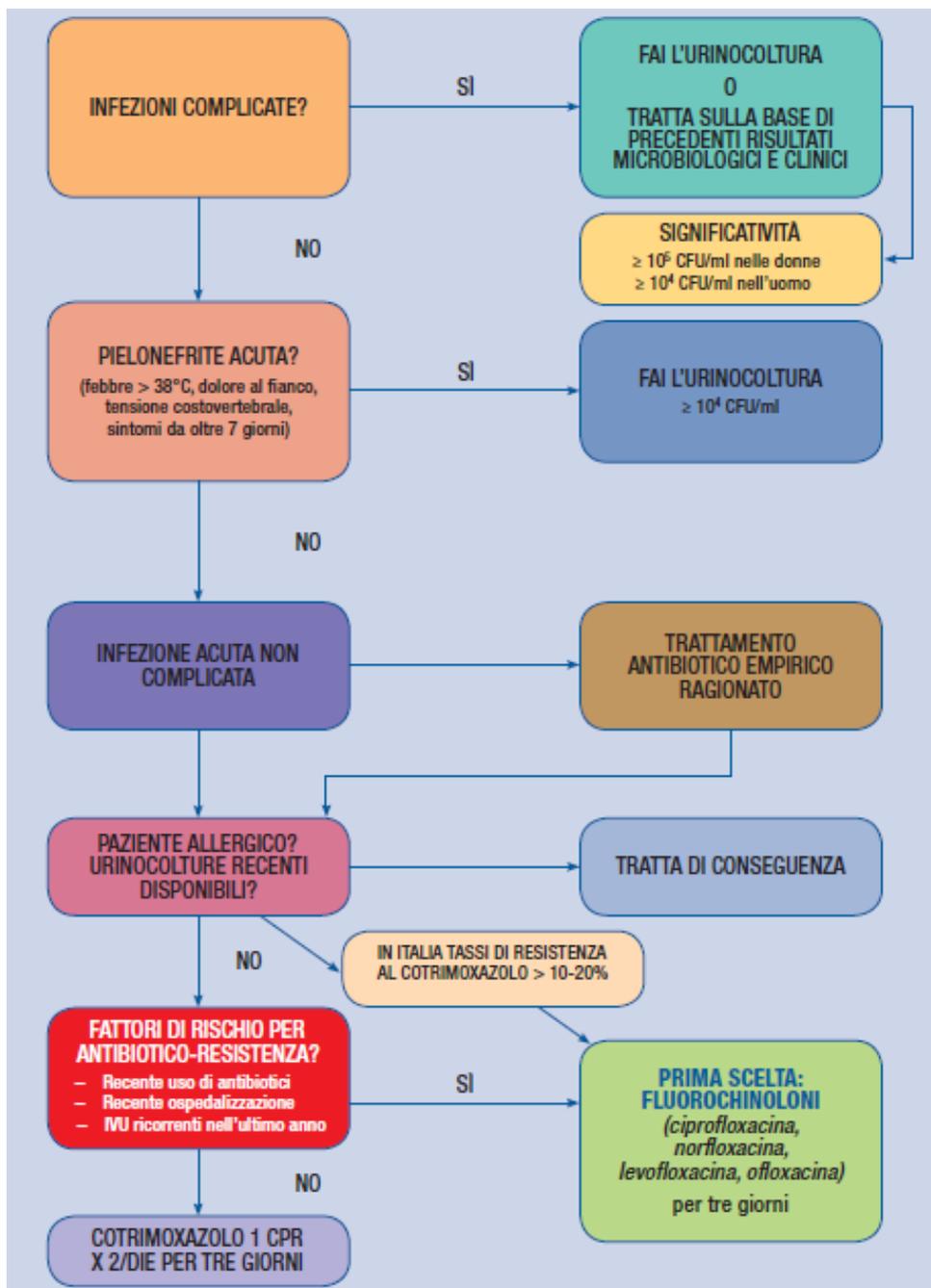


Figura 3 Terapia antibiotica empirica ragionata

Attuali linee guida per il trattamento delle infezioni genito-urinarie non complicate e complicate.			
Tipo di infezione urinaria	Patogeni più frequenti	Antibiotici suggeriti	Note
Batteruria asintomatica	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i>), Stafilococchi coag. neg., <i>Enterococcus</i> spp., Streptococchi gruppo B, <i>Gardnerella vaginalis</i> ; se anziani, lungodegenti e cateterizzati: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Morganella morganii</i>	Sulfonamidi, nitrofurantoina, cotrimoxazolo, penicilline, cefalosporine e fluorochinoloni [†] solo in caso di batteriuria asintomatica in: donne in gravidanza; donne con batteriuria da catetere se ancora positive dopo 48 ore dalla rimozione del catetere; pazienti sottoposti a chirurgia urologica nei quali sia prevedibile il sanguinamento della mucosa uro-genitale	Il trattamento, se indicato, deve protrarsi per 3-7 giorni. Lo screening e il trattamento non sono indicati in caso di batteriuria asintomatica in: donne in premenopausa non in gravidanza; donne diabetiche; anziani in comunità; anziani istituzionalizzati; pazienti con lesioni spinali; pazienti cateterizzati con catetere <i>in situ</i>
Cistiti non complicate o infezioni non complicate delle basse vie urinarie	<i>Escherichia coli</i> 90%, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cotrimoxazolo, fluorochinoloni [†] ; in alternativa: pivmecillinam [‡] , nitrofurantoina, fosfomicina trometamolo [§]	Utilizzando i farmaci di prima scelta il trattamento deve protrarsi per 3 giorni. Con le alternative la terapia deve invece essere di 7 giorni. Il cotrimoxazolo non deve essere utilizzato in contesti ove la resistenza degli uropatogeni supera il 10-20%
Pielonefriti acute non complicate	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fluorochinolone orale [†] o cotrimoxazolo se le resistenze lo consentono; in alternativa cefalosporine di 2 ^a e 3 ^a gen. orali, aminopenicilline/BLI (in caso di Gram positivi) ± aminoglicoside	La terapia orale con fluorochinoloni deve essere protratta nelle forme acute per 7-10 giorni. Nelle forme gravi deve essere utilizzata la terapia parenterale seguita, quando il paziente è stabile, da un fluorochinolone orale o dal cotrimoxazolo se le resistenze lo consentono
Infezioni delle vie urinarie complicate incluse le pielonefriti complicate; infezioni delle vie urinarie ospedalizzate	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> , altri enterobatteri, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>Candida</i>)	Fluorochinoloni [†] , aminopenicilline/BLI, cefalosporine 2 ^a gen., cefalosporine 3 ^a gen.; in caso di fallimento dopo 1-3 giorni di terapia iniziale o nei casi clinicamente gravi: fluorochinolone anti- <i>Pseudomonas</i> (ciprofloxacina) se non utilizzato come terapia iniziale, acilaminopenicilline/BLI, cefalosporina 3 ^a o 4 ^a gen., carbapenemici ± aminoglicosidi; in caso di <i>Candida</i> fluconazolo, amfotericina B	La terapia deve protrarsi 3-5 giorni dopo lo sfebbramento e la rimozione dei fattori complicanti
Epididimiti e prostatiti	<i>Escherichia coli</i> , altri enterobatteri, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Ureaplasma</i>	Fluorochinoloni [†] ; alternative nella prostatite acuta sono rappresentate da: cefalosporine di 2 ^a e 3 ^a gen.; in caso di <i>Chlamydia</i> o <i>Ureaplasma</i> : doxiciclina o macrolidi	La terapia delle forme acute si deve protrarre per 2 settimane e per le forme croniche 4-6 settimane o più
Urosepsi	<i>Escherichia coli</i> , altri enterobatteri; dopo manovre invasive urologiche prevedere patogeni multiresistenti: <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Cefalosporine di 3 ^a o 4 ^a gen., fluorochinolone anti- <i>Pseudomonas</i> , acilaminopenicilline/BLI, carbapenemici ± aminoglicosidi	La terapia deve protrarsi 3-5 giorni dopo lo sfebbramento e la rimozione o il controllo dei fattori complicanti

^{*} = non utilizzare i chinoloni in gravidanza; [†] = fluorochinoloni a elevata eliminazione urinaria; BLI = inibitori delle beta-lattamasi; [‡] pivmecillinam = unica beta-lattamina con documentazione adeguata, non in commercio in Italia (in genere comunque i beta-lattamici risultano meno efficaci dei fluorochinoloni o del cotrimoxazolo); [§] = fosfomicina trometamolo in somministrazione singola.

Tabella 1 Linee guida per il trattamento delle IVU

4.2 Resistenze batteriche

La resistenza agli antibiotici, così come ad altri composti che possiedono attività antintimicrobica, sta subendo un notevole incremento e la ricerca mira a trovare alternative per superare o, quanto meno, contenere tale problema.^[66] La resistenza agli antibiotici può essere considerata come la capacità dei microrganismi di alcune specie di sopravvivere, o anche moltiplicarsi, in presenza di concentrazioni di antimicrobici normalmente sufficienti per inibire o uccidere microrganismi della stessa specie. La resistenza agli antimicrobici, riconosciuta in clinica negli anni '50 (*penicillina* e stafilococchi; sulfamidici e gonococchi), è un fenomeno che si è accentuato nell'ultimo decennio ed investe l'intera popolazione, rappresentando un problema globale prioritario di salute pubblica, che riguarda Paesi sviluppati ed in via di sviluppo, con pesanti risvolti economici. Batteri responsabili di infezioni anche molto gravi e pericolose per la vita, quali *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii* ed altri Gram-negativi, enterococchi, stafilococchi, pneumococchi, hanno frequentemente raggiunto in diversi ambienti un tale grado di multiresistenza da diventare intrattabili anche con i più recenti antimicrobici.^[67,68] Problemi di primo piano sono posti dagli enterococchi

resistenti alla *vancomicina* (VRE), dagli stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA), dai bacilli Gram-negativi che producono β -lattamasi ad ampio spettro, da pneumococchi penicillino-resistenti ed eritromicino-resistenti, senza parlare delle serie preoccupazioni connesse alla multiresistenza del *Mycobacterium tuberculosis*. Lo sviluppo di resistenza è stato molto veloce negli ultimi anni; in ospedali statunitensi, la percentuale di VRE è salita da 0,3% nel 1989 a valori tra 4,9 e 10% nel 1993 (segnalazioni di 9,1% nel 1994) e nelle unità di terapia intensiva dallo 0,4%, nel 1989, al 13,6%, nel 1993.

Per quanto riguarda i microrganismi responsabili di infezioni comunitarie, la percentuale di *Streptococcus pneumoniae* multiresistenti è salita dal 3,6% nel 1987 al 14,5% nel 1994 ed al 23,6% (da aggiungere un altro 14,1% con ridotta sensibilità) nel 1995; dati più recenti attestano la resistenza a circa il 46%. Bisogna tener presente che negli USA lo *Streptococcus pneumoniae* è responsabile di 7.000.000 di casi di otite media, 500.000 casi di polmonite, 50.000 casi di sepsi, 3.000 casi di meningite all'anno, un numero imprecisato di bronchiti, endocarditi ed artrite settica.^[69,70] In grandi ospedali universitari statunitensi, la percentuale di MRSA tra ceppi di *Staphylococcus aureus* è salita dall' 8% nel 1986 al 40% nel 1992; in New

York City la percentuale è del 50%; dati ottenuti da 17 Paesi europei danno recentemente un valore di circa il 60%.^[71] Pericoloso, sebbene non quantificato, si profila il passaggio della resistenza alla *vancomicina* da enterococchi (VRE) a stafilococchi, per il largo impiego dell'antibiotico in pazienti con infezioni da MRSA.^[72,73] Fra le infezioni una volta sensibili ed ora resistenti agli antibiotici vanno ancora segnalate dissenteria da *Shigella dysenteriae* multiresistente, tifo da *Salmonella typhi* multiresistente, gonorrea da *Neisseria gonorrhoeae* resistente a *penicilline* e *tetracicline*.^[74]

La comunità scientifica si chiede quali siano le misure più opportune da adottare per contenere questo fenomeno, pur individuando nello sviluppo di nuovi principi attivi, unitamente ad un impiego più appropriato dei farmaci disponibili, le soluzioni più valide.^[75-77]

L'intenso uso degli antibiotici, anche in contesti diversi da quelli del controllo delle infezioni batteriche, è giustamente considerato alla base dell'evoluzione dei microrganismi verso la resistenza a questi composti. Tale fenomeno è emerso parallelamente all'introduzione degli antibiotici in terapia, ma solo recentemente si osservano fenotipi di resistenza molto variegati rispetto al passato, ove le differenze tra le minime concentrazioni inibenti (MIC) registrate con i ceppi sensibili e quelle con gli stiptipi

resistenti erano molto nette. E' ben noto che i batteri, sia a causa di mutazioni, sia per scambio di materiale genetico con altri microrganismi, possono ereditare le più disparate proprietà biochimiche, inclusa la capacità di sopravvivere in presenza di antimicrobici. Esistono, tuttavia, ceppi che in un solo evento genetico acquisiscono la completa resistenza ad alcuni antibiotici ed altri che evolvono verso tale fenotipo gradualmente attraverso più eventi successivi. Pertanto, accanto a stipiti totalmente resistenti che si differenziano nettamente in termini di MIC rispetto ai germi sensibili, si ritrovano sempre più facilmente batteri che mostrano un fenotipo cosiddetto "borderline", più difficili da individuare a causa della scarsa differenza tra la concentrazione di antibiotico necessaria per inibirne la crescita o consentirne lo sviluppo. In molti casi, infatti, i risultati possono essere influenzati da piccole variazioni dell'inoculo, della temperatura o di altri fattori che potrebbero modificare i valori delle MIC, con conseguente spostamento del microrganismo dalla categoria sensibile a quella resistente, intermedia o viceversa. In altre situazioni, il ceppo manifesta un fenotipo non facilmente decifrabile, a causa di alterazioni del tasso di crescita o di altre perturbazioni fisiologiche causate dalla mutazione che determina tale resistenza. Il germe può, inoltre, risultare sensibile ai saggi sulla base dei

valori limite, ma nascondere l'eventuale presenza di mutazioni che rappresentano già un'evoluzione verso l'insensibilità e che può essere individuata solo con ulteriori prove mirate. Se si prende come esempio il caso dei ceppi produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), l'NCCLS suggerisce di porre molta attenzione sui dati degli aloni registrati con la metodica dell'antibiogramma indicando che, anche se il ceppo risulta sensibile all'antibiotico saggiato, ma l'alone appare di dimensioni ridotte rispetto ai valori medi osservati con i ceppi di controllo, conviene effettuare prove aggiuntive al fine di confermare la presenza di un ceppo produttore di ESBL.^[78] Vale la pena ricordare, inoltre, che in vivo si instaurano facilmente condizioni di concentrazioni subinibenti la crescita, che sono note favorire la selezione di germi resistenti in particolar modo per stipti che possiedono meccanismi in corso di evoluzione, portandoli in breve tempo alla totale insensibilità. In questi casi al clinico rimane l'opzione di un farmaco alternativo o, in mancanza di scelte, l'uso di una combinazione di antibiotici. Quindi è soprattutto il microbiologo che può dare al clinico indicazioni per il corretto uso degli antibiotici, fornendogli indicazioni importanti sui fenotipi di resistenza più o meno palesi ritrovati attraverso le prove di laboratorio e sul loro significato. Un piccolo accorgimento

potrebbe ulteriormente aiutare sia il clinico che il microbiologo. Ad esempio, tutti gli esami biochimici o altri refertati dal laboratorio presentano anche i valori normali in cui un parametro dovrebbe essere incluso. Nel caso che vi siano valori prossimi a quella soglia, il clinico può consigliare al paziente di porre maggiore attenzione alla dieta alimentare o suggerire altre misure per non favorire un processo verso una conclamata patologia. Sulla base di questo esempio anche il microbiologo, invece di refertare un ceppo soltanto S, I, o R, dovrebbe dare informazioni su quelli che sono i criteri con cui si ottengono tali dati. Se il laboratorio indicasse nella risposta il valore del diametro in mm o quello della MIC, riportando accanto i valori normali delle diverse categorie, sarebbero messi in evidenza quei patogeni che presentano livelli di sensibilità prossimi al limite soglia a testimonianza di una possibile evoluzione negativa. Questa informazione sarebbe più completa e potrebbe aiutare il clinico ad una scelta più corretta degli antibiotici da utilizzare, riducendo sia il rischio di un fallimento terapeutico sia la diffusione di stipti che veicolano la resistenza agli antibiotici. Non va inoltre dimenticato che molte specie batteriche presentano un'intrinseca resistenza agli antibiotici che deve essere sempre ricordata indipendentemente dall'esito di un saggio di sensibilità. Le Tabelle

riportano rispettivamente esempi di resistenza intrinseca, di refrattarietà acquisita, in fase di evoluzione e gli antibiotici che più comunemente possono essere utilizzati come indicatori di resistenza [Tab. 2,3,4].^[79]

Specie	Resistenza naturale
<i>Enterobacteriaceae</i>	Penicillina, glicopeptidi, acido fusidico, macrolidi clindamicina, linezolid, streptogramine, mupirocin.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ampicillina, amoxicillina cefalosporine di I generazione.
<i>P.aeruginosa</i>	Ampicillina, amoxicillina, co-clavulanato, cefalosporine di I e II generazione, cefotaxime, ceftriaxone, acido nalidixico, trimetoprim.
<i>B.cepacia</i>	Ampicillina, amoxicillina, cefalosporine di I generazione, colistin, aminoglicosidi.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Tutti i β -lattamici eccetto ticarcillina-clavulanato, aminoglicosidi.
<i>Flavobacterium (Chryseobacterium/Myroides)</i>	Ampicillina, amoxicillina, cefalosporine di I generazione.
<i>Salmonella spp.</i>	Cefuroxime (attivo in vitro, non attivo in vivo).
<i>Klebsiella spp., Citrobacter diversus</i>	Ampicillina, amoxicillina, carbenicillina, ticarcillina.
<i>Enterobacter spp., C. freundii</i>	Ampicillina, amoxicillina, co-clavulanato, cefalosporine di I generazione, cefoxitin.
<i>M. morgani</i>	Ampicillina, amoxicillina, co-clavulanato, cefalosporine di I generazione, cefuroxime, colistin, nitrofurantoina.
<i>Providencia spp.</i>	Ampicillina, amoxicillina, co-clavulanato, cefalosporine di I generazione, cefuroxime, gentamicina, netilmicina, tobramicina, colistin, nitrofurantoina.
<i>Proteus mirabilis</i>	Colistin, nitrofurantoina.
<i>Proteus vulgaris</i>	Ampicillina, amoxicillina, cefuroxime, colistin, nitrofurantoina.
<i>Serratia spp.</i>	Ampicillina, amoxicillina, co-clavulanato, cefalosporine di I generazione, cefuroxime, colistin.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ampicillina, amoxicillina, carbenicillina, ticarcillina, cefalosporine di I generazione.
<i>Campylobacter jejuni, Campylobacter coli</i>	Trimetoprim.
<i>H. influenzae</i>	Penicillina G, eritromicina, clindamicina.
<i>M. catarrhalis</i>	Trimetoprim.
Batteri gram-positivi	Aztreonam, temocillina, colistin, acido nalidixico.
Streptococchi	Acido fusidico, aminoglicosidi (eccetto casi di sinergismo)*.
<i>S. pneumoniae</i>	Trimetoprim, aminoglicosidi.
<i>S. aureus meticillino-resistenti</i>	Tutti i β -lattamici
Enterococchi	Penicillina G, carbenicillina, ticarcillina, tutte le cefalosporine, aminoglicosidi*, mupirocina.
<i>Listeria</i>	Cefalosporine di III generazione, fluorochinoloni.
*Basso livello di resistenza: gli aminoglicosidi sono utili per il sinergismo con le penicilline contro i più comuni streptococchi e enterococchi.	

Tabella 2 Esempi di resistenza intrinseca

<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i>	Trimetoprim.
<i>H. influenzae</i>	Penicillina G, eritromicina, clindamicina.
<i>M. catarrhalis</i>	Trimetoprim.
Batteri gram-positivi	Aztreonam, temocillina, colistin, acido nalidixico.
Streptococchi	Acido fusidico, aminoglicosidi (eccetto casi di sinergismo)*.
<i>S. pneumoniae</i>	Trimetoprim, aminoglicosidi.
<i>S. aureus</i> <i>meticillino-resistenti</i>	Tutti i β -lattamici
Enterococchi	Penicillina G, carbenicillina, ticarcillina, tutte le cefalosporine, aminoglicosidi*, mupirocina.
<i>Listeria</i>	Cefalosporine di III generazione, fluorochinoloni.
*Basso livello di resistenza: gli aminoglicosidi sono utili per il sinergismo con le penicilline contro i piú comuni streptococchi e enterococchi.	

Tabella 3 Esempi di refrattariet  acquisita ed in fase di evoluzione

Organismi	Antibiotici
Stafilococchi	Acido fusidico, rifampicina, fluorochinoloni.
Stafilococchi eritromicino-resistenti	Clindamicina.
<i>S. pneumoniae</i>	Ciprofloxacina, levofoxacina.
<i>P. aeruginosa</i>	Tutti gli antibiotici anti-pseudomonas, escluso colistin e, probabilmente, meropenem.
<i>B. cepacia</i>	Tutti gli antibiotici rilevanti.
<i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Morganella</i>	Tutte le cefalosporine di III generazione
Coliformi con ESBL	Cefamicine (via impermeabilit�).
Tutti i coliformi	Fosfomicina, acido nalidixico (no fluorochinoloni).
<i>Serratia marcescens</i>	Netilmicina, tobramicina, amikacina, kanamicina.
Adattata da Livermore et al.(66).	

Tabella 4 Antibiotici comunemente utilizzati come indicatori di resistenza

4.3 Meccanismi genetici e biochimici di resistenza batterica

La resistenza extracromosomica è molto importante ed è tipica dei batteri, gli unici esseri viventi in grado di avere scambi di informazioni genetiche tra specie diverse. Grazie a tale fenomeno, ogni batterio ha virtualmente a disposizione l'intero corredo cromosomico di tutte le specie batteriche esistenti. Lo scambio d'informazione genetica avviene frequentemente tramite **coniugazione**, cioè attraverso lo scambio di elementi genetici extracromosomici denominati plasmidi; questi veicolano spesso trasposoni, in grado di "catturare" i geni responsabili della resistenza ad uno o più farmaci antimicrobici, i quali vengono poi trasferiti da specie in specie insieme ai plasmidi. Lo scambio d'informazione genetica può avvenire anche tramite **trasduzione** (fagi) o **trasformazione** (DNA libero). La resistenza a livello del genoma batterico si sviluppa come risultato di una mutazione spontanea in un locus che controlla la sensibilità ad un determinato agente antimicrobico. La presenza di un farmaco antimicrobico agisce, poi, come meccanismo selettivo sopprimendo i microrganismi sensibili e permettendo la crescita dei mutanti resistenti. L'incidenza di resistenza di ciascun patogeno è dipendente dalla pressione selettiva esercitata dalla quantità di farmaco impiegato in un determinato ambiente.

Quindi, il consumo di farmaci è il “motore” dell’incidenza delle resistenze.^[80-82] I batteri hanno a disposizione diverse alternative per evitare l’azione letale degli antibiotici:

- a) produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici;
- b) alterazione della permeabilità dell’involucro;
- c) alterazione del bersaglio;
- d) sistemi di trasporto attivo;
- e) vie metaboliche alternative.

a) Produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici

Poiché gli antibiotici più diffusi in terapia sono i β -lattamici, uno dei meccanismi di resistenza più frequenti è la produzione di β -lattamasi. Questo enzima è in grado di idrolizzare l’anello β -lattamico dell’antibiotico, annullando totalmente la sua attività antibatterica. I Gram-positivi liberano tale enzima nell’ambiente circostante, impedendo al farmaco di entrare a contatto con i batteri. Nei Gram-negativi la produzione di β -lattamasi avviene, invece, a livello dello spazio periplasmico ove l’antibiotico viene di fatto neutralizzato.^[81,83] La prima β -lattamasi è stata descritta nel 1965 ed

è veicolata da un plasmide coniugativo ritrovato in un ceppo di una giovane paziente di nome Timoniera, da cui ne è derivato il nome di β -lattamasi TEM-1. Ad oggi sono noti più di 300 tipi diversi di β -lattamasi che conferiscono resistenza alle penicilline ed alle cefalosporine di I e II generazione. A queste sono da aggiungere le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), originatesi per mutazione puntiforme di TEM-1 e SHV-1, e capaci di inattivare le cefalosporine di III generazione, ma non i carbapenemici o le combinazioni con inibitori suicidi. Le ESBL sono prevalentemente diffuse tra le *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*) e, in particolare, in *K. pneumoniae* (~20%). L'idrolisi dell'anello β -lattamico può essere impedita utilizzando i cosiddetti "inibitori suicidi", cioè β -lattamici inizialmente scartati per la loro modesta potenza antibatterica, ma poi rivalutati perché capaci di legarsi in modo covalente alle β -lattamasi, bloccando la loro attività enzimatica e impedendo l'inattivazione dell'altro eventuale farmaco presente. Gli inibitori suicidi oggi in uso sono: *acido clavulanico*, *tazobactam* e *sulbactam*. Questi composti vengono abbinati a penicilline (ad esempio: *amoxicillina* + *acido clavulanico*) o cefalosporine e garantiscono loro immunità dalle più diffuse

β -lattamasi. Altri enzimi inattivanti gli antibiotici sono: acetil-trasferasi, fosforil-trasferasi, adenil-trasferasi. Queste proteine non idrolizzano l'antibiotico, ma reagiscono chimicamente con esso, trasferendo diversi gruppi chimici in vari siti del principio attivo, con conseguente modificazione della sua attività. Di questo gruppo fanno parte gli enzimi che inattivano gli aminoglicosidi, i quali possono essere acetilati, fosforilati o adenilati, con conseguente inattivazione dovuta al loro mancato accumulo all'interno della cellula batterica e all'impossibilità di legarsi alle molecole bersaglio. Il *cloramfenicolo* può essere inattivato dall'enzima CAT (*Cloramfenicolo* acetil-trasferasi), che acetila i gruppi idrossilici della molecola rendendola non tossica nei confronti della cellula.^[81,83,84]

b) Alterazione della permeabilità dell'involucro

L'alterazione della permeabilità è considerata come un **meccanismo di resistenza intrinseca**, cioè comune a tutti i microrganismi della stessa specie. Ad esempio, i batteri Gram-negativi non sono sensibili ai glicopeptidi poiché la loro membrana esterna è naturalmente impermeabile a questi antibiotici, mentre i batteri Gram-positivi, per simili motivi, non sono inibiti dall'*acido nalidixico*, dall'*aztreonam* e dalle *polimixine* (assenza

membrana esterna). Per quanto riguarda l'alterazione della permeabilità dell'involucro, è da ricordare che sulla membrana dei batteri Gram-negativi sono normalmente presenti le OMP (Outer Membrane Proteins), le quali hanno funzione di canale per il passaggio di antibiotici; l'alterazione di queste proteine può impedire l'ingresso dell'antimicrobico nella cellula batterica (ad esempio: *chinoloni* e β -lattamici).^[85]

c) Alterazione del bersaglio

Negli stafilococchi, la resistenza all'*oxacillina* (*meticillina*) è dovuta all'acquisizione di un gene detto *mecA* veicolato da un trasposone che codifica per una nuova PBP2'. I ceppi OXA-R, oltre che acquisire la resistenza crociata a tutti i β -lattamici, mostrano spesso resistenza ai chinoloni, macrolidi, aminoglicosidi, *rifampicina*, ecc. Negli pneumococchi vi è stata acquisizione di geni dalla popolazione microbica normale (streptococchi orali) di PBP 1°, 2X, 2B e 2° che sono differenti dalle originali, conferendo resistenza alla *penicillina*. Per quanto riguarda la resistenza a *cefotaxime* e *ceftriaxone*, le PBP 1° e 2X risultano alterate, mentre le altre PBP non sembrano avere affinità per le cefalosporine di III generazione. La resistenza ai chinoloni è dovuta ad una mutazione

cromosomica che modifica la DNA girasi e rende l'enzima resistente a tale classe di farmaci (alterazione della subunità A della DNA-girasi); in questo caso, è sufficiente la sostituzione di un aminoacido con un altro per rendere il microrganismo resistente. La resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi è dovuta ai geni *VanA*, *VanB*, *VanC*, che codificano per una proteina che modifica un precursore della parete; il nuovo precursore non è più sequestrato dall'antibiotico e la sintesi del peptidoglicano procede. Per i macrolidi e i lincosamidi si ha metilazione del residuo di adenina sull'RNA ribosomiale 12S della subunità 50S del ribosoma che, quindi, impedisce all'antibiotico di interagire con il ribosoma stesso.^[81-83, 86]

d) Sistemi di trasporto attivo

Il meccanismo di efflusso più noto riguarda la *tetraciclina*. I prodotti dei geni *tet* sono delle proteine transmembrana che trasportano attivamente le *tetraciclina* dall'interno all'esterno della cellula batterica, impedendo l'accumulo dell'antibiotico. I geni *tet* sono di classe A-E negli enterobatteri, di classe K-L nei Gram-positivi; come esempio possiamo citare il gene *tetL*, a localizzazione plasmidica, il quale codifica per un sistema di efflusso che conferisce un basso livello di resistenza alla *tetraciclina*. Un meccanismo

simile è noto negli streptococchi dove il gene *mef*, veicolato da trasposoni, conferisce resistenza ad *eritromicina* e ad altri macrolidi a 14-15 atomi ma non a macrolidi a 16 atomi, lincosamidi e streptogramine; questo fenotipo è noto come fenotipo M. Negli stafilococchi il sistema di efflusso è attivo per macrolidi a 14-15 atomi e streptogramine, ma non per i lincosamidi. Sempre negli stafilococchi è stato identificato il gene *norA* che elabora una proteina in grado di trasportare all'esterno i chinoloni. Studi recenti indicano che in ceppi come *Pseudomonas* questo meccanismo di resistenza è molto efficace. Un ulteriore esempio di efflusso sono le “multidrug resistance pumps”: pompe di efflusso non specifiche, ma in grado di espellere antibiotici di varie strutture chimiche, le quali sono presenti in importanti patogeni multiresistenti (*N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ecc.).^[80-83]

e) Vie metaboliche alternative

I microrganismi sono in grado di sviluppare delle alternative alle consuete vie metaboliche, in modo da evitare l'inibizione della reazione da parte del farmaco. Ad esempio, in alcuni batteri resistenti al *trimethoprim*, l'enzima acido diidrofolico reductasi è inibito in modo del tutto trascurabile rispetto a quanto avviene nei batteri *trimethoprim*-sensibili; oppure alcuni stipiti

sulfamido-sensibili *in vitro* non necessitano di PABA extracellulare, mentre possono utilizzare l'acido folico preformato, ma risultano resistenti *in vivo*.^[80-82]

4.4 Considerazioni sulle resistenze batteriche

Tutti i problemi riguardanti le resistenze cui si è fatto cenno trovano un unico momento comune: l'entità dell'utilizzo di antimicrobici. L'uso esteso di antimicrobici nell'uomo, negli animali e nei vegetali è un fattore di primo piano nel determinare la selezione di microrganismi resistenti. Paesi con le più alte percentuali di resistenza antibatterica tra patogeni umani e con il più elevato consumo pro-capite di antibiotici, hanno documentato che esiste un livello critico di consumo di farmaci antimicrobici oltre il quale si scatena l'emergenza di resistenza.^[87] Lo scopo fondamentale degli interventi che da oggi possono essere attuati è impedire che la resistenza agli antimicrobici divenga un problema di dimensioni ancora maggiori e conservare l'utilità degli antimicrobici oggi disponibili. Va inoltre tenuto in considerazione che, nell'ultimo decennio, non è stato introdotto alcun antibatterico con nuovo meccanismo d'azione, sebbene ve ne siano alcuni di recente o prossima commercializzazione per scopi selettivi in terapia, come *everninomicine* e *ossazolidoni*. Si dovrebbero, pertanto, intraprendere azioni che possano ridurre l'uso degli antimicrobici in tutti i settori di impiego: medicina umana e veterinaria, produzione animale e protezione di piante. La restrizione nell'uso degli antimicrobici esistenti in tutti gli attuali settori di applicazione

dovrebbe portare al controllo ed al contenimento della resistenza. L'uso di antimicrobici in produzione animale dovrebbe essere totalmente abbandonato e, comunque, al più presto sostituito con quello di composti che non abbiano alcuna possibile relazione con antimicrobici impiegati in medicina umana e veterinaria, per evitare il rischio di selezionare microrganismi con resistenza crociata ai farmaci usati per trattare le infezioni batteriche. Le condizioni di stabulazione degli animali destinati all'alimentazione umana dovrebbero essere migliorate, in modo da evitare il diffondersi di epidemie ed il conseguente ricorso ad antimicrobici di impiego anche in medicina umana. Gli antimicrobici usati in terapia e quelli che possono presentare resistenza, anche crociata, con questi non dovrebbero essere utilizzati in OGM. I geni marcatori di resistenza agli antimicrobici dovrebbero essere rimossi dai vegetali transgenici prima della commercializzazione. Nell'uomo dovrebbe essere evitato l'uso di antimicrobici a largo spettro non necessari, ad esempio in caso di infezioni urinarie. Inoltre, l'uso di antimicrobici in molte infezioni dell'albero respiratorio non dovute a batteri può influenzare il decorso della malattia, eccetto in pazienti che abbiano o nei quali siano possibili superinfezioni batteriche. Ridotte permanenze ospedaliere, trattamento domiciliare di

pazienti con malattie serie o complicate, aumentato trasferimento ad ospedali per acuti ovvero a strutture per degenze prolungate, intensificazione degli schemi di pulizia e ricorso a stanze singole, sono tutti fattori che possono ridurre in assoluto l'insorgenza ed il trasferimento di resistenze in ospedale e nel rapporto ospedale-territorio. Negli ospedali americani si tenta di tener separati pazienti con VRE o MRSA per evitare che, per scambio di materiale genetico, si passi da un ceppo di *Staphylococcus aureus* a resistenza intermedia alla *vancomicina* ad un ceppo pienamente resistente a tale antibiotico. È necessario poi cercare di ottimizzare l'approccio prescrittivo abituale degli antimicrobici. Ciò può esser ottenuto in diversi modi: nel medio periodo, migliorando e rendendo più sensibili e con risultati più rapidi possibili i test diagnostici per le malattie infettive, onde instaurare in tempi brevi una terapia con antimicrobici mirati; nel lungo periodo, rivisitando totalmente con inventiva gli schemi terapeutici finora adottati per i trattamenti con antimicrobici di malattie infettive, senza seguire soltanto quelli derivanti dai trial clinici finanziati dalle industrie produttrici per soddisfare le autorità regolatorie. Potrebbero derivarne utili indicazioni per ottimizzare le dosi, l'intervallo tra queste e la durata del trattamento. Infine, dovrebbero essere adottate note di

indirizzo e guide terapeutiche che tendano a razionalizzare il più possibile l'impiego almeno dei più importanti antimicrobici nel trattamento di malattie dell'uomo e degli animali e a scoraggiare la pratica di prescrivere antimicrobici inutili o superflui per infezioni in grado di autolimitarsi ad eziologia non batterica. Si dovrebbero poi identificare nuove vie per controllare e contenere la resistenza e valutare quanto velocemente, e con quale intensità, la resistenza sia reversibile quando l'uso dell'antimicrobico si riduce.^[88]

CAPITOLO 5

Meccanismi di patogenicità dei batteri uropatogeni

5.1 Patogenicità batterica

Un batterio può essere definito patogeno quando esso si dimostra capace di invadere i tessuti di un organismo e di moltiplicarvisi, danneggiando in maniera più o meno grave il normale funzionamento dell'organismo ospite, con la produzione di una o più sostanze tossiche specifiche. Quindi, moltiplicazione *in vivo* e tossigenicità rappresentano le due componenti principali del potere patogeno. L'attecchimento e la moltiplicazione *in vivo* di un batterio patogeno ed il danno che esso è in grado di provocare attraverso la sua azione tossigena, sono la conseguenza di numerose proprietà, quali la capacità di penetrare attraverso l'epitelio mucoso nei tessuti profondi, la produzione di particolari molecole in grado di alterare l'ambiente tissutale rendendolo terreno fertile per lo sviluppo microbico, la possibilità di evadere le difese antimicrobiche costitutive e/o inducibili dell'organismo e, infine, la tossicità di alcuni componenti della cellula batterica e proteine dotate di un selettivo potere tossico in grado di sovvertire il normale funzionamento di specifiche cellule bersaglio.

I batteri patogeni, una volta penetrati nell'organismo ospite, si moltiplicano negli spazi intercellulari o all'interno di elementi cellulari. La moltiplicazione intracellulare può seguire tre diverse vie: **preferenziale**, tipica di batteri in grado di parassitare cellule del sistema reticolo-endoteliale o in grado di sopravvivere all'interno dei fagociti (listerie, brucelle, micobatteri); **transitoria o occasionale**, nel caso di batteri in grado di penetrare le cellule dell'epitelio mucoso per aprirsi un varco verso i tessuti della sottomucosa (maggioranza dei batteri patogeni per l'uomo); **obbligata**, scelta da batteri che non possono fare a meno delle strutture e del metabolismo della cellula ospite, a causa delle proprie limitate possibilità metaboliche (chlamydie, rickettsie). Alcuni batteri possono penetrare attraverso lesioni prodotte sulla cute a seguito di traumi accidentali (*Clostridium tetani*) o trasferiti attraverso la puntura di un artropode vettore (*Bartonella bacilliformis*) o il morso di un animale infetto (*Spirillum minor*). Altri batteri, invece, si localizzano sull'epidermide aprendosi, eventualmente, un varco verso i tessuti sottocutanei attraverso lesioni, frutto di un processo infiammatorio localizzato (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*). L'interazione dei batteri patogeni con le cellule degli epiteli mucosi è mediata da fattori localizzati sulla superficie della

cellula batterica o secreti all'esterno della cellula stessa. Un primo importante gruppo di fattori batterici in grado di condizionare la fase iniziale del processo infettivo è rappresentato dalle cosiddette **adesine**, che consistono in strutture superficiali di diversa natura. Esse sono costituite fondamentalmente da proteine presenti all'estremità delle **fimbrie o pili**, da proteine di superficie in grado di legarsi alla membrana di cellule eucariotiche o a proteine della matrice intercellulare e da alcuni polisaccaridi capsulari. Le diverse adesine di natura proteica generalmente agiscono da **lectine**, interagendo in modo specifico con particolari residui glicidici di glicoproteine o di glicolipidi presenti sulla superficie delle cellule degli epitelii mucosi o nelle molecole della matrice intercellulare. Anche i materiali capsulari possono favorire l'adesione batterica a superfici lisce (ad esempio *Streptococcus mutans* alla superficie dello smalto dentale) e, a volte, nel caso di batteri in grado di produrre notevoli quantità di materiale capsulare ed in presenza di condizioni favorevoli, la moltiplicazione batterica è seguita dalla formazione di **biofilm**. Si tratta di complesse strutture, formate da un'estesa matrice di materiale capsulare contenente numerosi batteri, le quali possono invadere zone ampie di mucosa. Esempi tipici sono dati dalle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*

a carico della mucosa respiratoria di soggetti affetti da fibrosi cistica, fascite necrotizzante prodotta da alcune specie di *Streptococcus pyogenes* e produzione di biofilm su valvole cardiache, superfici di materiali inerti introdotti a scopo terapeutico (fili di sutura, impianti protesici). All'interno del biofilm, i batteri sono relativamente resistenti all'azione degli effettori delle difese antimicrobiche costitutive o inducibili e possono rappresentare anche un difficile bersaglio per numerosi farmaci antibatterici che non riescono a diffondere efficacemente attraverso la spessa matrice di materiale capsulare che ingloba i batteri. Questa organizzazione dei batteri è causa di infezioni persistenti ed una delle condizioni infettive di più difficile approccio terapeutico. Una volta ancorati alla superficie di un epitelio mucoso, i batteri patogeni tendono a moltiplicarsi ed iniziano un vero e proprio dialogo biochimico (cross-talking) con le cellule epiteliali. Ciò è reso possibile dalla produzione di una serie di molecole, per lo più di tipo proteico, in varia misura tossiche, che vengono eliminate all'esterno della cellula batterica. Data la complessità degli involucri batterici di superficie, nei batteri Gram-negativi la secrezione delle varie proteine tossiche avviene attraverso specifici sistemi secretori, costituiti da complessi organuli cellulari. Quest'ultimi vengono utilizzati anche per l'esportazione di altri

tipi di proteine, utilizzate per l'assemblaggio di strutture quali pili e flagelli.

Una serie di evidenze sperimentali dimostrano che l'attivazione dei diversi geni che codificano i differenti prodotti effettori dell'azione patogena batterica è, almeno parzialmente, regolata da una serie di "segnali" che i batteri, una volta insediati sulla mucosa dell'organismo ospite, ricevono dalla nuova situazione ambientale, nonché attraverso un'ulteriore serie di segnali indicati globalmente con il termine di "*quorum sensing*". Essi divengono operanti quando la concentrazione di una serie di molecole segnalatrici liberate nell'ambiente esterno dai batteri ed in grado di interagire con recettori presenti sulla superficie degli stessi batteri produttori, raggiunga o superi una concentrazione critica nel microambiente parassitato, segnalando così il raggiungimento di una certa soglia di consistenza numerica, il "*quorum*", da parte della popolazione batterica. La colonizzazione batterica di una mucosa ha come fine ultimo la distruzione localizzata dell'epitelio. Ciò produce l'apertura di un varco ed il passaggio dei batteri verso la sottomucosa, riccamente vascolarizzata. I batteri, comunque, sono in grado di attraversare l'epitelio mucoso in una fase molto precoce, utilizzando peculiari meccanismi invasivi che consentono la diretta penetrazione nelle cellule dell'epitelio mucoso. In alcune situazioni, una

volta diffuso alla sottomucosa, il processo infettivo resta relativamente confinato, sebbene i batteri possano invadere i tessuti vicini grazie alla produzione di esoenzimi quali ialuronidasi, proteasi, DNasi, collagenasi, elastinasi, fosfolipasi. Quest'ultimi, oltre a digerire le sostanze macromolecolari circostanti, trasformandole in risorse nutritive per il batterio, facilitano l'apertura di veri e propri varchi nella sostanza fondamentale del connettivo (invasine) o provocano danneggiamenti irreversibili nelle cellule. I batteri possono anche produrre delle proteine tossiche molto potenti che, diffondendo per via ematica, possono coinvolgere in modo sistemico l'organismo ospite, compromettendo la funzionalità di diversi organi ed apparati (tossiemia). In altre circostanze, invece, i batteri patogeni dopo essere penetrati nella zona sottomucosa, possono diffondere per via ematica (batteriemia), linfatica o essere veicolati da fagociti. In quest'ultimo caso, i batteri vengono liberati nell'ambiente circostante a seguito della lisi del fagocita stesso, colonizzando tessuti ed organi anche molto distanti. Una volta nei tessuti profondi dell'organismo ospite, i batteri patogeni mettono in opera una serie di meccanismi intesi ad evadere le difese antibatteriche costitutive o inducibili (aggressine). Diverse sono le modalità con cui i batteri possono ostacolare l'attività fagocitica.

Esempi ne sono le fibrille, strutture di superficie ad azione anti-fagocitaria costituite da proteina M ed acidi teicoici presenti in *Streptococcus pyogenes*, o le capsule. La presenza di una spessa capsula, infatti, consente la protezione del batterio dal contatto con vari peptidi ad azione antibatterica presenti nei fluidi organici.^[89]

5.2 Adesività batterica: generalità

Un'importante proprietà dei batteri patogeni, cosiccome dei batteri commensali dei diversi epiteli mucosi, è rappresentata dalla loro capacità di aderire in maniera specifica e selettiva alla superficie cellulare. Ciò è dovuto all'interazione stereospecifica di strutture esterne del batterio, che globalmente prendono il nome di **adesine**, con recettori cellulari. Le adesine sono rappresentate da una grande varietà di polimeri complessi quali proteine, polisaccaridi, acido lipoteicoico combinati variamente tra loro. La presenza di tali strutture si riscontra a livello delle fimbrie batteriche e, in altri casi, nella membrana esterna batterica indipendentemente dalla presenza di fimbrie. Un esempio caratteristico di adesina di natura polisaccaridica è dato dalla matrice anionica del glicocalice batterico che consente a molte specie batteriche di formare microcolonie sulla superficie del tessuto ospite. A riguardo, un esempio tipico è fornito dai ceppi mucosi di *Pseudomonas aeruginosa*. Per quanto riguarda l'acido lipoteicoico, componente della parete cellulare dei cocci Gram-positivi, esso si lega a molti tipi di cellule eucariotiche grazie ad un'interazione col recettore per la fibronectina. Lo stesso recettore è responsabile dell'adesione di *Streptococcus mutans* alla superficie dei denti, con conseguente formazione

della placca dentaria. I recettori presenti sulla superficie delle cellule eucariotiche sono rappresentati, a loro volta, dalla porzione glucidica di glicoproteine o glicolipidi di membrana, anche da proteine di membrana con siti in grado di legare differenti strutture lipidiche. Il rapporto tra polisaccaridi capsulari ed adesività è impostato in una diversa direzione. Infatti, l'adesione rappresenta un vantaggio per il fatto che il batterio riesce a colonizzare su una superficie mucosa; di contro, può rappresentare un elemento di svantaggio allorchè le adesine vadano ad interagire con recettori presenti sulle cellule fagocitiche, promuovendo così l'ingestione e l'eliminazione del batterio patogeno da parte delle stesse. Un efficace strumento per contrastare gli effetti nocivi dell'interazione adesine-fagociti è rappresentato dalla sintesi di materiali capsulari che, se presenti in notevoli quantità, sono in grado di mascherare le adesine impedendone, così, l'interazione con i recettori delle cellule eucariotiche. I polimeri capsulari possono inibire le interazioni in svariati modi: variando le cariche di superficie del batterio; alterando l'idrofobicità di superficie; modificando l'orientamento spaziale delle adesine alla superficie della cellula batterica.^[90]

5.3 Adesività nelle Infezioni delle Vie Urinarie

L'ingresso dei batteri nell'apparato urinario non implica necessariamente lo sviluppo di una infezione, che dipenderà dalla virulenza, dal numero dei microrganismi, dall'efficacia dei meccanismi difensivi dell'ospite e dall'eventuale presenza di fattori favorenti l'infezione. Poiché la maggioranza delle Infezioni delle Vie Urinarie sono causate da *Escherichia coli*, gran parte degli studi riguardano l'attività di tale batterio. *E. coli* è un ospite normale dell'organismo umano, in cui rappresenta la specie predominante nella popolazione batterica aerobia-anaerobia facoltativa residente nell'intestino crasso. Si tratta di un esempio classico di batterio opportunist-patogeno ovvero, pur facendo parte della normale flora microbica intestinale, può causare diverse malattie se raggiunge altri distretti dell'organismo: tra queste, l'infezione urinaria è sicuramente la più frequente ed importante. Il più importante fattore di virulenza è rappresentato dalla capacità del batterio di aderire in maniera specifica e selettiva alla superficie dell'urotelio: l'**adesività batterica**. Ciò è conseguenza dell'interazione stereospecifica tra strutture proteiche superficiali del microrganismo, le **adesine**, localizzate all'estremità distale di filamenti sottili chiamati **fimbrie** (o pili) [Tab.5], con specifici recettori

presenti sulla superficie delle cellule uroepiteliali costituiti da glicolipidi di membrana [Fig. 4]. Ciò consente al batterio di restare adeso all'epitelio, nonostante il lavaggio meccanico prodotto dal flusso urinario. L'aderenza batterica alle cellule epiteliali delle vie escrettrici costituisce il primo passo della colonizzazione; seguono la penetrazione della mucosa, l'avvio del processo infiammatorio e la comparsa della sintomatologia. Sulla base della capacità del mannosio di interferire sull'adesività batterica, si distinguono due tipologie di pili: **pili di tipo I**, mannosio sensibili; **pili di tipo II**, mannosio resistenti.

Organelle	Specific adhesin	Host receptors	Cells recognized	Associated disease
Type 1 pili	FimH	Mannosylated glycoproteins (e.g. UP1a and CD48), Tamm-Horsfall protein, type 1 and type IV collagens, laminin, fibronectin	Bladder and kidney epithelial cells, buccal cells, erythrocytes, mast cells, macrophages, neutrophils, extracellular matrix, other bacteria, implants	Cystitis, sepsis, meningitis
P pili	PapG(I, II, III)	GbO3, GbO4, GbO5	Kidney epithelial cells, erythrocytes	Pyelonephritis
S/F1C pili	SfaS, SfaA/FocH	Sialic acid residues, plasminogen/ β -GalNac-1,4-Gal	Bladder and kidney epithelial cells, erythrocytes, endothelial cells	Ascending UTIs, sepsis, meningitis
Dr adhesins	Various	DAF (CD55), CD66e, type IV collagen, $\alpha_5\beta_1$ integrin	Bladder and kidney epithelial cells, erythrocytes, neutrophils, interstitial compartments of kidney	Cystitis, pyelonephritis, diarrhoea, sepsis

Tabella 5 Adesine comunemente associate agli UPEC

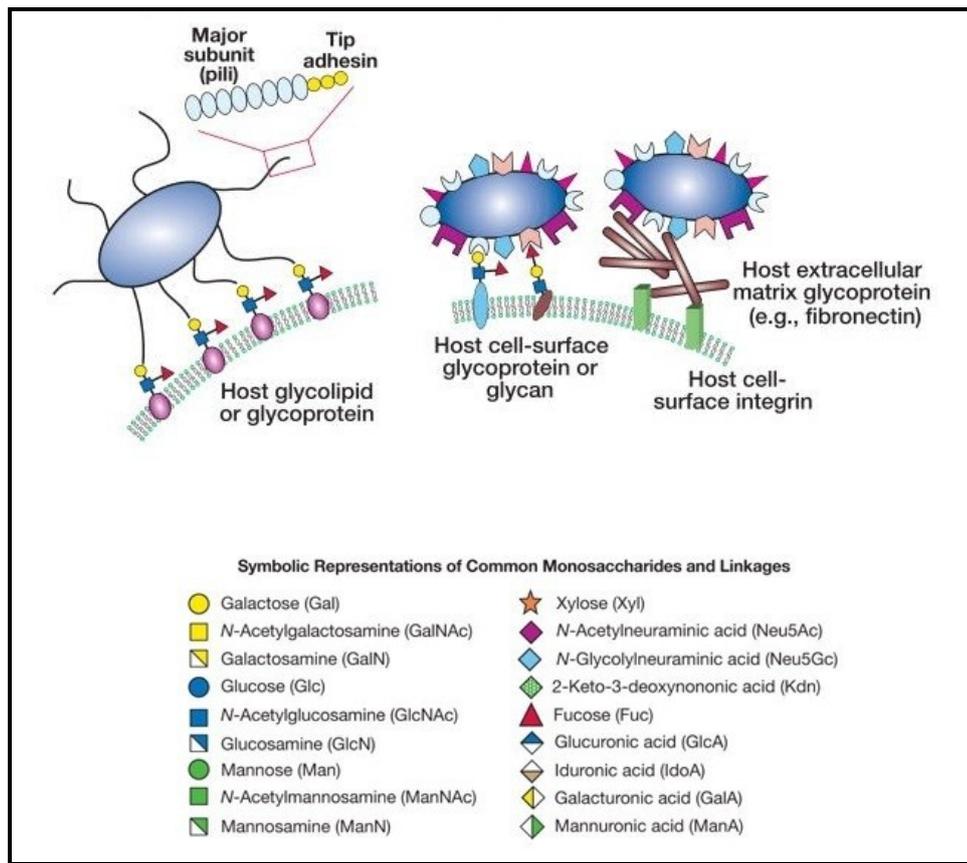


Figura 4 Interazione adesine-cellule uroepiteliali

Oltre *Escherichia coli*, i più importanti uropatogeni che hanno sviluppato meccanismi di adesione sono *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* e *Staphylococcus saprophyticus*. L'adesività batterica è notevolmente condizionata dallo stato secretorio dell'ospite. Nei secreti mucosi dei soggetti normali (fenotipo secretore) sono presenti sostanze, uromucoidi e glicoproteiche, che legano avidamente i pili di tipo I; nei soggetti con infezioni ricorrenti (fenotipo non secretore), invece, si nota un deficit secretivo di tali sostanze. Ciò evidenzia

come, in alcuni soggetti, i fattori genetici siano in grado di determinare la reattività della mucosa genito-urinaria nei confronti dei batteri uropatogeni e che la virulenza del batterio avrebbe un ruolo di minore importanza. E' importante sottolineare che la presenza di fimbrie non è condizione assoluta per l'insorgenza di un'Infezione delle Vie Urinarie, poiché i germi non fimbriati possono aderire all'urotelio grazie ad ulteriori meccanismi (adesine non fimbriali, meccanismi aspecifici costituiti da legami di tipo idrofobico, produzione di proteasi anti-IgA). Svariati sono i meccanismi di difesa contro le Infezioni delle Vie Urinarie e comprendono diversi fattori, sia di tipo anatomico che funzionale:

- 1) **barriera glomerulo-capillare**: nonostante il suo piccolo spessore, costituisce un'efficace protezione contro la diffusione ematogena dei batteri;
- 2) **l'epitelio che riveste i calici, la pelvi, gli ureteri, la vescica e l'uretra**: costituisce una barriera meccanica contro l'invasione batterica, tant'è vero che un danno della sua integrità favorisce l'instaurarsi di un'infezione;
- 3) **mucina che riveste l'urotelio**: sostanza costituita da anticorpi, frazioni del complemento, opsonine e lisozima, in grado di inibire

l'adesività batterica.

L'attività antiadesiva della mucina si spiega con la spiccata idrofilia dei polisaccaridi di superficie (glicosaminoglicani) in esse contenuti.

Quest'ultimi, infatti, legandosi alle molecole di acqua formano una barriera idrofila interposta tra l'urotelio e le sostanze disciolte nell'urina, compresi i batteri;

- 4) **IgA secretorie**: sono prodotte dalle plasmacellule presenti nella lamina propria dell'urotelio. Tali immunoglobuline sono dotate di una componente secretoria che ne condiziona il trasporto trans-epiteliale e funge da recettore legandosi alla superficie batteri, inibendo così la capacità dei microrganismi di aderire alle cellule epiteliali. Il loro effetto protettivo è indirettamente dimostrato dal fatto che la produzione risulta significativamente ridotta nei pazienti con IVU ricorrenti;
- 5) **uromucoide di Tamm-Horsfall**: glicoproteine prodotte dalle cellule della mucosa uretrale e vescicale, ricche di radicali mannosio liberi, in grado di captare e bloccare le fimbrie di tipo I ed impedire la colonizzazione batterica;
- 6) **integrità della giunzione uretero-vescicale e presenza di una**

papilla renale non refluyente: impediscono, rispettivamente, il reflusso verso il rene dell'urina vescicale ed il reflusso nell'interstizio renale dell'urina pellica;

- 7) **diluizione delle urine vescicali e svuotamento completo della vescica:** determinano un vero e proprio lavaggio periodico dei germi presenti in uretra distale;
- 8) **attività battericida del secreto prostatico** (contenente il PAF, fattore antibatterico prostatico) **e delle secrezioni vaginali acide.**^[91]

5.4 Strutture batteriche e adesività

Pili di tipo I

I **pili di tipo I** contengono da 500 a 3000 subunità **FimA**, che costituiscono l'asse elicoidale. Inoltre, all'estremità della fibrilla, sono presenti le subunità **FimF**, **FimG** e l'adesina **FimH**. La subunità **FimH**, a differenza delle altre, presenta due domini: un dominio di lectina N-terminale, **FimHL**, ed un dominio di pilina C-terminale, **FimHP**, quest'ultimo riscontrato anche nelle altre subunità. La subunità **FimD**, invece, risulta legata alla membrana esterna batterica [Fig. 5].^[92]

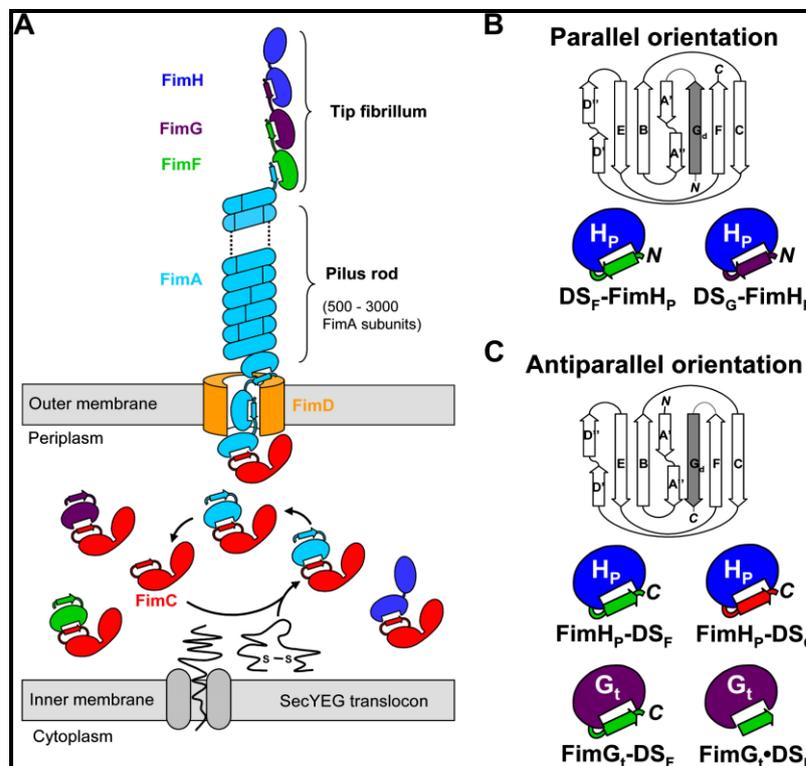


Figura 5 Struttura dei Pili di tipo I

La subunità FimH [Fig. 6, 7] consente l'adesione del batterio a glicoproteine ed epitopi peptidici non glicosilati dell'ospite, comprese le IgA secretorie, il glicofosfatidilinositolo (GPI) ancorato alla proteina CD48,^[93,94] l'antigene carcinoembrionale correlato alla famiglia delle molecole di adesione cellulare (CEACAM),^[95,96] la proteina Tamm-Horsfall,^[97] l'NCA-50 (Non-specific Cross-reacting Antigen),^[96] le molecole di adesione ai leucociti CD11b e CD18,^[98] le subunità di integrina $\alpha 3$ e $\beta 1$,^[99] l'uropalachina 1a (UP1a),^[100] le proteine di collagene di tipo I e di tipo IV associate alla matrice extracellulare,^[101] la laminina^[102] e la fibronectina.^[103] In diversi studi, nei quali sono state utilizzate cellule epiteliali della vescica, è stato dimostrato come le subunità FimH siano necessarie e, allo stesso tempo, sufficienti per l'innesco del processo invasivo.^[104]

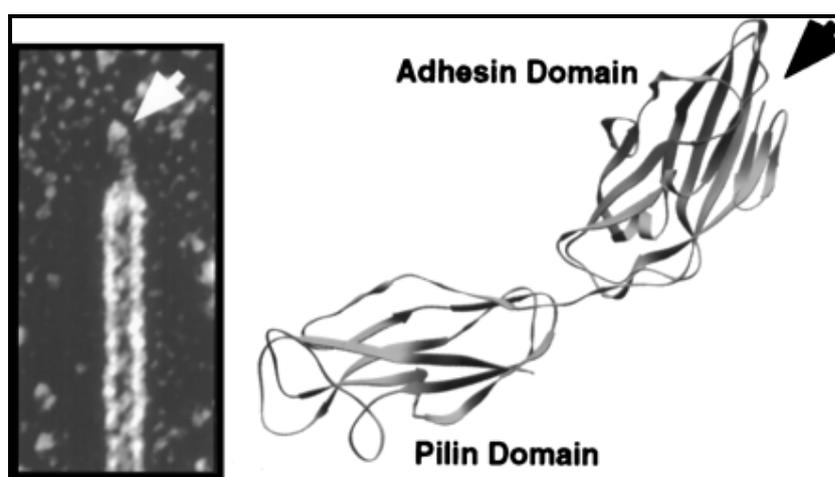


Figura 6 Particolare della subunità FimH del pilo di tipo I

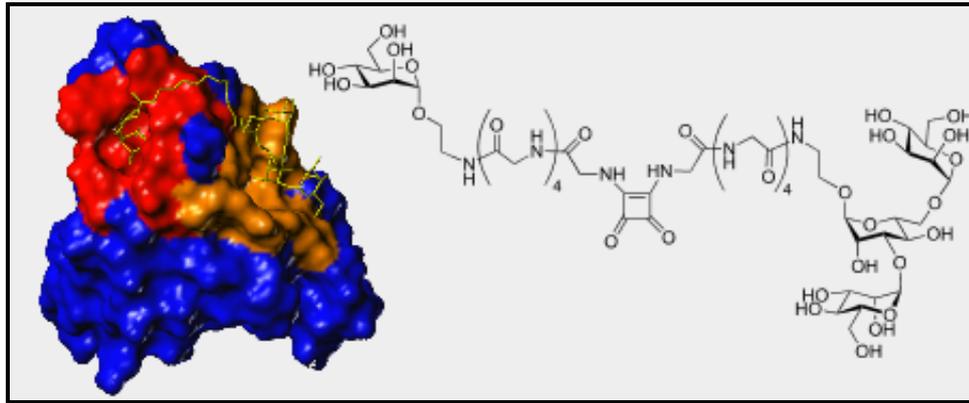


Figura 7 Struttura molecolare del dominio di FimH

L'invasione batterica delle cellule ospiti da parte di FimH può essere mediata dalle **subunità di integrina $\alpha 3$ e $\beta 1$** [Fig.8].^[99] Le integrine sono delle proteine di membrana, costituite da subunità α e β , che in condizioni normali legano la matrice extracellulare al citoscheletro di actina.^[105] FimH è in grado di legare individualmente le subunità di integrina $\alpha 3$ e $\beta 1$ grazie ad N-glicani ad alto mannosio, indipendentemente dalla classica tasca di legame formata dagli eterodimeri $\alpha 3\beta 1$.^[99] I recettori costituiti da integrina $\alpha 3$ e $\beta 1$, raggruppati attorno al batterio adeso, coincidono con l'accumulo di F-actina a livello dei siti interessati dall'invasione batterica. I siti di fosforilazione localizzati nella porzione citoplasmatica dell'integrina $\beta 1$, modulano la variazione conformazionale della proteina stessa e consentono, altresì, il reclutamento e l'attivazione di svariati adattatori e trasmettitori di segnale, gran parte dei quali sono implicati nell'invasione

delle cellule ospiti mediata da FimH [Fig. 9].

Nella cascata di eventi è inclusa la stimolazione nella cellula ospite di GTPasi, quali **Rac1**, e l'attivazione di **Src** e **FAK** (Focal Adhesion Kinase).^[99,104,106,107] La formazione del **complesso di transizione tra FAK ed IP-3-chinasi**, come osservato nel corso del processo di invasione, stimola la produzione del secondo messaggero, **3-fosfoinositide**, che può modulare la dinamicità dell'**actina**, mentre la formazione del complesso tra la proteina adattatrice **α -actinina** e la **vinculina** si rivela utile nella stabilizzazione dei riarrangiamenti del citoscheletro.^[104,108-110]

In particolare, mutazioni a livello della porzione citoplasmatica dell'integrina $\beta 1$, caratterizzate dalla sostituzione della treonina 788 e 789 con alanina e la sostituzione della tirosina 783 e 795 con fenilalanina, portano ad un'evidente inibizione dall'invasione batterica mediata da FimH.^[99] Di contro, la sostituzione della serina 785 con alanina incrementa, per ragioni ancora non comprese, la frequenza dell'invasione batterica.

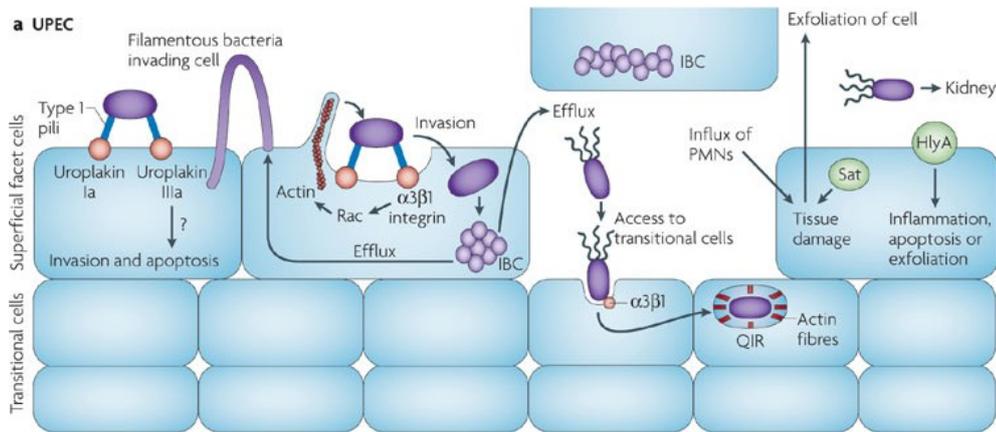


Figura 8 Interazione tra pilo di tipo I e cellule uroepiteliali

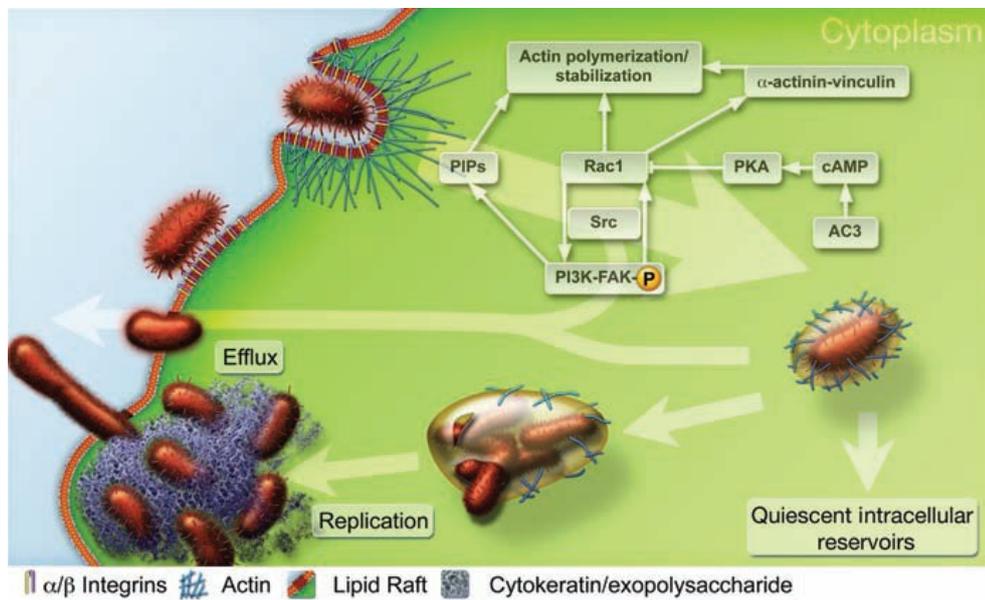


Figura 9 Cascata di eventi intracellulari mediati dal pilo di tipo I

Nessuna di queste mutazioni interferisce con l'adesione dei batteri alla cellula ospite. In alcuni recenti lavori, si è dimostrato come la cellula ospite sia in grado di sviluppare dei meccanismi per aggirare alcuni dei segnali della cascata di eventi che promuovono l'invasione dei batteri uropatogeni. I risultati, infatti, mostrano come l'incremento dei livelli intracellulari di AMP-ciclico dovuti all'attivazione del recettore TLR4 (Toll-like receptor 4) incida negativamente sull'attività di Rac1, causando interferenza col processo d'invasione batterica.^[107] Non appena i batteri uropatogeni si ritrovano all'interno della cellula, la continua espressione del pilo di tipo 1 può anche incrementare la produzione di **IBC** (Intracellular Bacterial Community) [Fig. 10], stimolando così l'aggregazione batterica e la formazione di biofilm.^[111] La biosintesi intracellulare di un'altra adesina, chiamata **Ag43** (Autotransporter Protein Antigen 43), può promuovere e determinare, in maniera simile all'IBC, l'aggregazione batterica.^[112-114]

I pili di tipo I sono espressi da più del 90% dei ceppi di *Escherichia coli* isolati, sia patogeni che commensali. Essi sono importanti per la maggior parte dei batteri uropatogeni, in quanto consentono un'efficace colonizzazione del tratto urinario.^[115-120]

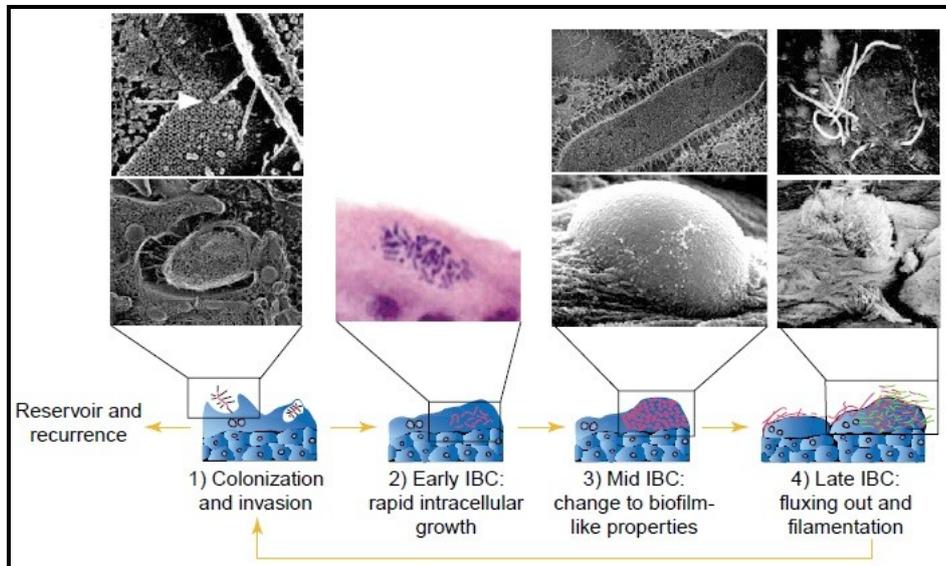


Figura 10 Produzione di IBC (Intracellular Bacterial Community)

Pili di tipo II

I **pili di tipo II** riconoscono sulla superficie dell'urotelio un recettore glicosfingolipidico identico a quelli del sistema sanguigno di gruppo P. I pili di tipo II che interagiscono con tali recettori prendono il nome di **pili o fimbrie P**, caratteristici dei ceppi pielonefritogeni di *E. coli*.^[91] Essi sono costituiti dall'adesina **PapG**, posta all'estremità della fibra, che consente l'adesione alla superficie delle cellule uroepiteliali dell'ospite. Inoltre sono presenti una proteina adattatrice **PapF**, una proteina fibrillare **PapE**, un'ulteriore proteina adattatrice **PapK** e circa 1000 copie di una pilina strutturale chiamata **PapA** [Fig. 11].^[121]

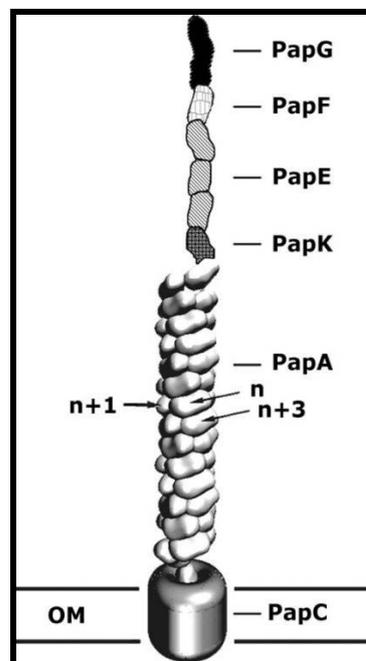


Figura 11 Struttura del pilo di tipo II

Diversi studi hanno dimostrato come il pilo P rappresenti un importante fattore di virulenza associato alla pielonefrite nel processo di adesione al tessuto renale. Inoltre, si è evidenziato come l'adesina PapG non sia necessaria nel processo di colonizzazione della vescica da parte dei batteri uropatogeni.^[122] Il recettore per l'adesina PapG prende il nome di **Globotriasilceramide (GbO3)** e consiste in un digalattoside (Gal α 1-4Gal) legato ad un residuo di β -glucosio, ancorati alla membrana da un gruppo ceramide.^[123,124] L'alterazione del complesso Gal α 1-4Gal di GbO3, per addizione di una molecola di N-acetil-galattosammina, produce **GbO4 (globoside)**. L'addizione di due molecole di N-acetil-galattosammina, invece, determina la formazione di **GbO5 (antigene di Forsmann)**. Tre distinte varianti dell'adesina PapG, designate con GI, GII, GIII, sono state identificate e riconosciute rispettivamente in GbO3, GbO4 e GbO5. Ciò ha suggerito che le differenti varianti di PapG potessero influenzare la specificità dei ceppi uropatogeni nei confronti delle cellule ospiti. Studi successivi, comunque, hanno reso dubbia tale possibilità.^[125]

L'assemblaggio del pilo P [Fig. 12] avviene grazie a proteine periplasmiche chiamate "**chaperones**" (**PapD**) e complessi di proteine localizzate nella

membrana esterna, chiamate “ushers” (**PapC**). Le proteine chaperones sono fondamentali per la stabilizzazione ed il trasporto delle subunità, tant’è vero che la loro assenza o un loro eventuale malfunzionamento non consentono l’assemblaggio del pilo.^[126-129] I domini C- ed N- terminali delle ushers sono, invece, importanti per l’incorporazione delle subunità nel pilo in formazione. Il dominio N-terminale delle ushers consente il riconoscimento e l’associazione con i complessi chaperones-subunità, mentre il dominio C-terminale risulta fondamentale per le successive manipolazioni.^[130-134]

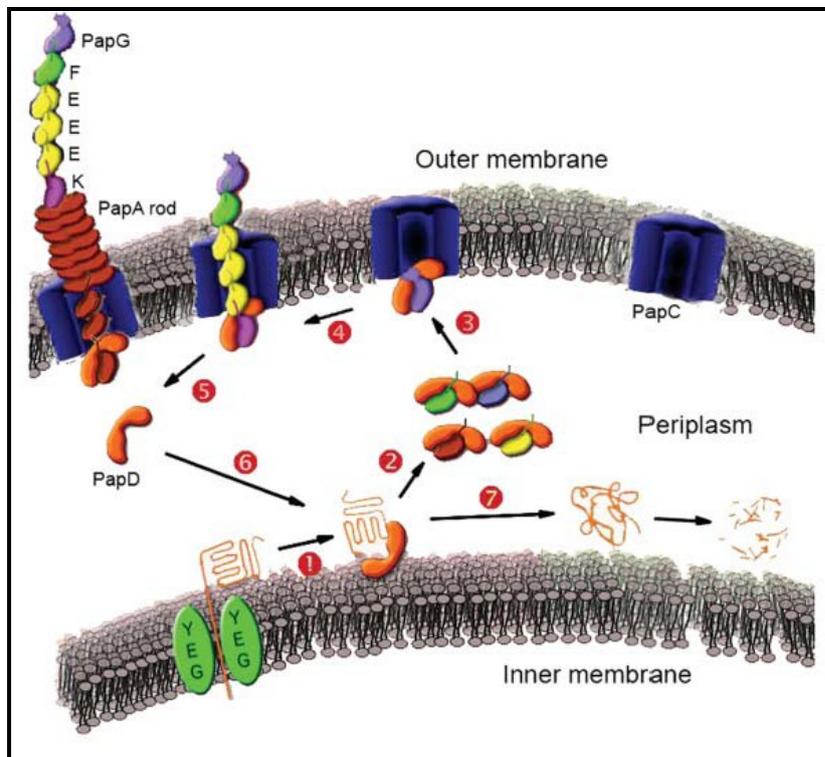


Figura 12 Processo di assemblaggio del pilo di tipo II

Pili di tipo S ed F1C

I **pili S** possiedono una struttura simile a quella dei pili di tipo I ed ai pili P, ma non altrettanto ben definita.^[135] Le fibre che li costituiscono sono formate da una subunità maggiore, **SfaA**, e da tre subunità minori **SfaG**, **SfaH** e **SfaS**. La subunità SfaS è localizzata all'estremità del pilo S e può mediare l'interazione batterica con i residui di acido sialico espressi dalle cellule dell'endotelio epiteliale e vascolare del rene.^[136-139] La subunità maggiore SfaA possiede anche adesine caratteristiche che possono aderire ai glicolipidi e plasminogeno delle cellule endoteliali.^[140,141] La subunità minore, insieme alla SfaS, può anche modulare la capacità di legame del pilo S.^[135,142] Quest'ultimo può facilitare la diffusione batterica attraverso i tessuti dell'ospite ed è spesso associato ai ceppi di *E. coli* che causano sepsi, meningite ed infezioni ascendenti delle vie urinarie, inclusa la pielonefrite.^[143-146] Recenti lavori hanno dimostrato che i residui di acido sialico sono esposti da **UP3 (Uroplachina 3)**, una proteina integrale di membrana notevolmente espressa nella superficie luminale della vescica. Ciò suggerisce che potrebbe svolgere un importante ruolo nelle cistiti.^[147] Sono stati identificati degli organelli adesivi che presentano un'omologia strutturale ai pili S, sebbene differiscano nella specificità recettoriale.^[146,148]

Tra tali omologhi strutturali si ricorda il **pilo F1C**, in grado di legare i residui di β -GalNac-1 e 4 β -Gal presenti sui glicolipidi espressi dalle cellule epiteliali dei tubuli distali, dei dotti collettori del rene ed anche dalle cellule endoteliali del rene e della vescica. I pili F1C sono codificati da circa il 14% di UPEC isolati. Ciò indica che essi possano svolgere un compito importante nella patogenesi di un gran numero di casi di Infezioni delle Vie Urinarie.^[149]

Adesine Dr

Questo gruppo di adesine include le adesine fimbriali associate agli uropatogeni e le adesine non fimbriali AFA-I, AFA-II, AFA-III, AFA-IV, Nfa-I e Dr II.^[150] Le **adesine Dr** si riscontrano nella colonizzazione ascendente e nell'infezione interstiziale cronica delle vie urinarie. Studi epidemiologici indicano che circa la metà dei bambini con Infezioni delle Vie Urinarie e circa il 30% delle donne in gravidanza con pielonefrite sono colonizzate da ceppi UPEC che esprimono le adesine Dr. Inoltre, un'eventuale infezione con ceppi di *E. coli* che esprimono tali adesine può determinarne la ricorrenza. Il contributo delle adesine Dr in termini di virulenza e persistenza delle infezioni può essere sostanziale. Recentemente, è stato riportato che i ceppi UPEC che codificano le adesine Dr, ma non i batteri Dr⁻, possono sopravvivere per più di un anno nel tessuto renale.^[150,151] Alcuni membri della famiglia delle adesine Dr sono in grado di riconoscere una o più di quattro sequenze ripetute di 60 aminoacidi, le **brevi sequenze consenso (SCR)**, presenti nel **fattore di decadimento accelerato (DAF, CD55)**, una glicoproteina legata al fostatidil-inositolo espressa sugli eritrociti ed altri tessuti, incluso l'uroepitelio.^[150] Differenti membri della famiglia delle adesine Dr sembrano riconoscere distinte

sequenze SCR all'interno del DAF. L'incremento dell'espressione del DAF nel tratto urinario durante la gravidanza può determinare un incremento di suscettibilità di infezioni nelle donne gravide che presentano UPEC Dr⁺.^[152]

Le adesine Dr sono anche in grado di legare **l'antigene carcinoembrionico (CD66e)**, una proteina con funzione ancora sconosciuta, ed il **collagene di tipo IV**. Le adesine Dr, interagendo con il DAF, altri recettori come il collagene di tipo IV e CD66e, può promuovere l'adesione batterica ai compartimenti interstiziali del rene e può facilitare la persistenza a lungo termine dei batteri nelle alte vie urinarie.^[150,153]

5.5 Sierotipi UPEC

La classificazione tradizionale dei ceppi di *Escherichia coli* è basata sulla presenza di certi **antigeni O (somatici)**, **K (polisaccaride capsulare)** ed **H (flagellare)**. Un'associazione tra l'espressione di specifici antigeni capsulari e la patogenicità di *E. coli* è stata ben documentata, ma non è stato ancora ben chiarito a quali di essi sia legata. L'antigene O, che definisce più di 176 sierogruppi, è un polisaccaride che consiste in 10-25 subunità zuccherine ripetute ed ancorate alla porzione esterna del **lipopolisaccaride (LPS)**, componente della membrana batterica.^[154] Negli UPEC si riscontra una maggiore frequenza degli antigeni O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 ed O75 rispetto a quella degli antigeni specifici K ed H.^[155,156] Un esempio ne sono gli UPEC isolati e sequenziati CFT073 (O6), 536 (O6), UTI89 (O18), così come altri due ceppi spesso utilizzati, ovvero J96 (O4) ed F11 (O6). L'antigene capsulare K1 è tipicamente associato ai ceppi **ExPEC (Extracellular Pathogenic *E. coli*)** che causano la meningite neonatale (NMEC) e svolge il compito di proteggerli sia dai batteriofagi che dal sistema del complemento. Inoltre esso incrementa la sopravvivenza batterica nelle cellule dell'endotelio microvascolare del cervello e facilita l'evasione dalla fagocitosi mediata da fagociti professionali.^[157-161] Sebbene non vi

siano prove certe nel coinvolgimento di specifici antigeni K nella patogenesi mediata da UPEC, è stato notato che UPEC recanti gli antigeni K1 oppure O18 codificano più fattori di virulenza rispetto a quelli riscontrati in ExPEC isolati.^[162] E' interessante notare che il ceppo UTI89, molto studiato e responsabile delle cistiti umane, mostra il sierotipo NMEC O18:K1:H7. Quest'ultimo può contribuire alla spiccata virulenza di tale particolare ceppo batterico.^[155,162]

5.6 UPEC: secrezione tossine

La capacità dei batteri patogeni di produrre tossine è ben conosciuta. La maggior parte degli UPEC possiedono i **sistemi secretori di tipo I e di tipo V** ma non i sistemi secretori di tipo III che altri patogeni, normalmente, utilizzano per far penetrare molecole effettrici all'interno delle cellule ospiti.^[163] Un prototipo di tossina secreta dai sistemi di tipo I, l' **α -emolisina (HlyA)**, è codificata da circa il 50% degli UPEC isolati e la sua espressione è associata ad un incremento della gravità clinica nei pazienti affetti da Infezioni delle Vie Urinarie.^[164,165] Gli UPEC isolati CFT073 e UTI89 contengono una copia dell'operon per l'emolisina, l' **HlyCABD**, mentre il ceppo 536 ne contiene due copie. HlyA [Fig. 13] è una tossina Calcio-dipendente di 110 kDa che, a concentrazioni elevate, è in grado di formare grandi pori da 2 nm nelle cellule ospiti, conducendole alla lisi ^[166-169] La funzione primaria dell'HlyA consiste nella distruzione della cellula ospite, facilitando il rilascio di sostanze nutrienti e ulteriori fattori, ad esempio il ferro, che sono fondamentali per la crescita batterica. Comunque, non è ancora chiaro il motivo per cui la tossina HlyA spesso, nel corso di uno stato infettivo, raggiunga concentrazioni elevate utili alla lisi delle cellule ospiti. Ad ogni modo, in condizioni fisiologiche la concentrazione della tossina

non è tale da consentire la lisi cellulare. Recenti studi hanno dimostrato che le basse concentrazioni di un certo numero di tossine in grado di produrre pori può modulare una grande varietà di segnali intracellulari, quali la variazione della concentrazione di calcio, l'attivazione di MAP-chinasi, l'alterazione della fosforilazione degli istoni e dei sistemi di acetilazione.^[170,171] Inoltre, è stato visto come possano determinare un'importante inattivazione della **serina/treonina chinasi Akt**, che gioca un ruolo centrale nella progressione del ciclo replicativo nella cellula ospite, nel metabolismo, nel trasferimento di vescicole, nella sopravvivenza e nella trasmissione dei segnali infiammatori.^[172]

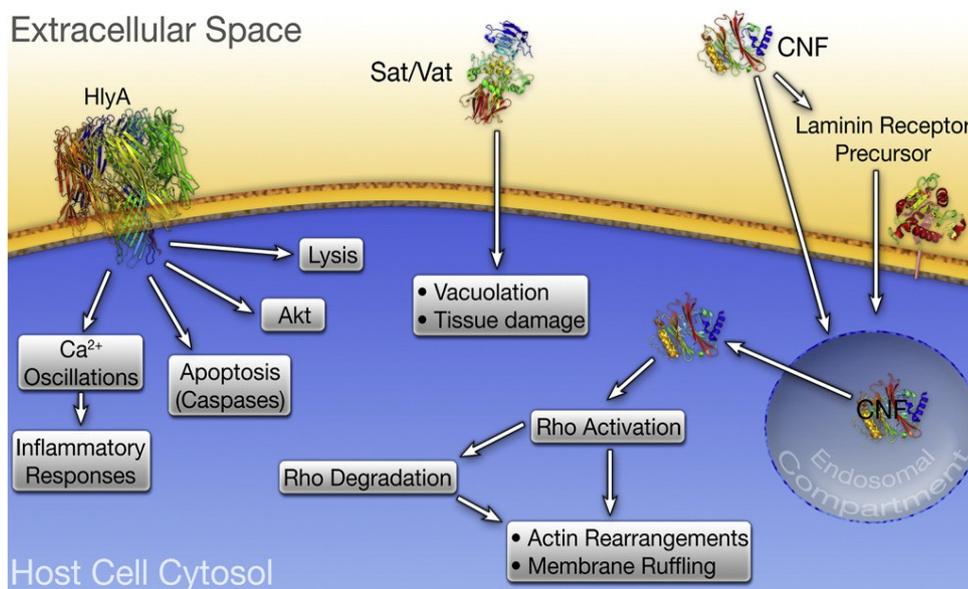


Figura 13 UPEC e produzione di tossine

Ciò spiega i risultati ottenuti in lavori precedenti, nei quali si sottolineava la necessità di concentrazioni sublitiche di Hly_a per l'inibizione della chemiotassi batterica e l'uccisione dei batteri da parte dei fagociti, così come la mediazione da parte di tale tossina del processo apoptotico cellulare e l'attivazione dei processi infiammatori.^[173-177] ExPEC codifica anche per tossine secrete da sistemi di tipo V, conosciute come "autotrasportatrici".^[163] Due di queste tossine, **Vat (Vacuolated Autotransporter Toxin)** e **Sat (Secreted Autotransporter Toxin)**, sono spesso espresse dagli UPEC isolati.^[162,178] CTF073 codifica sia per Vat che per Sat, mentre i ceppi 536 e UTI89 codificano solo per Vat. Vat e Sat sono state inizialmente caratterizzate per la loro capacità di indurre una grande varietà di effetti citopatici nella cellula ospite, incluse la vacuolizzazione ed il rigonfiamento. Malgrado il ruolo di Vat nella patogenesi delle Infezioni delle Vie Urinarie non sia stato studiato in maniera approfondita, è stato visto come tale tossina sia in grado di incrementare la virulenza degli **APEC (Avian Pathogenic *E. coli*)**.^[179] L'espressione di Sat da parte di CFT073, invece, è in grado di determinare un importante danneggiamento a carico del rene di cavia, causando dissoluzione della membrana glomerulare, perdite dalle cellule dell'epitelio tubulare e vacuolizzazione del tessuto

renale.^[180,181] Paradossalmente, Sat non sembra influenzare l'abilità di CFT073 nel colonizzare il tratto urinario della cavia. Si sta indagando sull'eventuale presenza di ulteriori tossine autotrasportatrici codificate dagli UPEC. Le tossine espresse dagli UPEC non sono necessariamente secrete "nude", ma possono essere associate a **vescicole di membrana (OMV)** che gemmano dalla superficie batterica. Le OMV sono sfruttate da alcuni batteri per facilitare la comunicazione, lo scambio di materiale genetico, l'adesione batterica, l'invasione nelle cellule ospiti ed il rilascio di tossine.^[182,183] Esse sono utilizzate dai batteri per proteggere il "carico tossico" diretto verso la cellula ospite. **HlyA e CNF1 (Citotoxic Necrotizing Factor 1)** sono un esempio di tossine prodotte dagli UPEC e trasportate in OMV.^[184-186] Approssimativamente, circa un terzo degli UPEC isolati codifica per CNF1, incluso il ceppo UTI89. La tossicità di tale proteina da 113 Kda è attribuita alla sua abilità di attivare le GTPasi della famiglia Rho: **RhoA, Rac** e/o **Cdc42**.^[187] L'attivazione delle GTPasi Rho colpisce numerose funzioni delle cellule eucariotiche, inclusa la formazione delle ASF (Actin Stress Fiber), di lamellipodia, di filopodia, l'induzione dell' "increspamento" della membrana e la modulazione dei segnali infiammatori.^[188] Per esercitare il suo effetto CNF1, grazie al legame al precursore per il recettore della

laminina esposto sulla superficie cellulare, può ottenere l'accesso al citosol, innescando la captazione ed il trasferimento della tossina nel compartimento endosomiale. Condizioni di acidità presso tale compartimento, induce la traslocazione del dominio catalitico del CNF1 attraverso la membrana vescicolare e, quindi, all'interno del citosol dell'ospite ove stimola le GTPasi della famiglia Rho.^[187] Un'attivazione prolungata delle GTPasi Rho conduce alla sua ubiquitinazione e conseguente degradazione proteosomica. L'attivazione della GTPasi Rho da parte del CNF1 si configura, quindi, come un processo temporaneo e la citotossicità correlata al CNF1 è dovuta sia all'attivazione di una proteina Rho aberrante e la sua conseguente degradazione. Il meccanismo attraverso il quale CNF1 è incorporato nelle OMV e lo specifico ruolo che tali vescicole svolgano nella liberazione del CNF1 nelle cellule ospiti non è attualmente noto. In condizioni sperimentali, grazie all'utilizzo di modelli di IVU in cavie, gli UPEC che producono CNF1 presentano notevoli vantaggi all'interno delle cellule della vescica e dei reni.^[189,190] L'espressione di CNF1 da parte degli UPEC può determinare l'insorgenza di IVU sfruttando diverse vie. Può promuovere l'apoptosi delle cellule epiteliali di vescica, probabilmente stimolando la loro esfoliazione e incrementando l'accesso dei batteri nel tessuto sottostante.^[191] Inoltre, la

degradazione proteosomica della GTPasi Rho Rac attivata dal CNF1, producendo “increspamento” cellulare e formazione di filopodia, porta anche ad un incremento della motilità cellulare e della captazione batterica.^[192] Recentemente è stato visto che la secrezione del CNF1 contenuto nelle OMV da parte dell’UPEC CP9 determina l’inibizione dei fagociti e dell’attività chemiotattica dei neutrofilo. Quindi, tali effetti mediati da CNF1 possono facilitare la diffusione e persistenza degli UPEC nel tratto urinario.^[185,193]

5.7 ABU (Asymptomatic Bacteriuria *E. coli*)

Gli ABU (Asymptomatic Bacteriuria *E. coli*) sono particolari ceppi batterici in grado di persistere nel tratto urinario per mesi o anni senza determinare apparente sintomatologia clinica. Essi si comportano da commensali con l'ospite e, in alcuni casi, sembrano proteggere il tratto urinario dalla colonizzazione di ceppi UPEC. In particolare, il ceppo ABU 83972 è in grado di crescere raggiungendo cariche batteriche elevate nelle cellule di vescica umane ed è effettivamente in grado di competere con i prototipi di UPEC fatti crescere sia nelle urine umane che nei modelli di IVU nelle cavie.^[194] Per tale ragione, il ceppo ABU 83972 è stato sfruttato per ridurre la frequenza di IVU asintomatiche in volontari umani ed è attualmente oggetto di investigazioni cliniche sia in USA che in Europa.^[195] Il genoma di ABU 83972 contiene molti geni associati agli UPEC che codificano per fattori di virulenza quali pili di tipo1, pili di tipo S, pili di tipo F1C, fimbrie P, α -emolisina e sistemi di acquisizione multipla del ferro. Ad eccezione di quest'ultimo, per gli altri fattori di virulenza il gene che li codifica è risultato non funzionale e in diverse condizioni di decadimento genetico.^[196-198] Questa ossevizione suggerisce che i ceppi ABU siano "discendenti" di molti altri UPEC capaci di determinare stati tossici ed

infiammatori.^[199] In seguito alla crescita nel tratto urinario umano o di cavia, ABU 83972 mostra una significativa up-regulation trascrizionale dei sistemi di acquisizione del ferro (enterobactina, aerobactina, salmochelina, *chu* e *sit*) e un'evidente down-regulation del gene che codifica per le fimbrie, dell'operon per l' α -emolisina e del *rfaH*, un regolatore universale della virulenza degli UPEC.^[194,200,201] I ceppi ABU, paragonati ad UPEC isolati di riferimento, si sono anche dimostrati capaci di produrre biofilm.^[202] Queste modifiche genetiche e comportamentali, riscontrate nel ceppo 83972 ed in altri ABU, consentono ai batteri di crescere a titolo elevato in ambienti poveri di ferro, come ad esempio le urine, senza provocare evidenti risposte immunitarie. Gli attuali studi mirano a capire meglio come i ceppi ABU siano in grado di proliferare e persistere nel tratto urinario senza provocare evidenti alterazioni nell'ospite, ipotizzando un eventuale possibile utilizzo di tali batteri a scopo profilattico. Inoltre, possono aiutare a comprendere la funzione di possibili fattori di virulenza prodotti dagli UPEC nel corso di stati patologici a carico dell'ospite.^[194,203,204]

5.8 *Escherichia coli* e formazione del biofilm

Il **biofilm** è una comunità strutturata di cellule batteriche racchiusa in una matrice polimerica autoprodotta ed aderente ad una superficie inerte o vivente.^[205]

La formazione del biofilm avviene in 5 stadi [Fig. 14]:

- 1) **avvicinamento della cellula planctonica**, attraverso il flusso del fluido o la motilità, alla superficie solida e attacco reversibile, grazie al superamento delle forze repulsive. La superficie solida è generalmente “condizionata”, nel senso che essa è modificata a causa dell’assorbimento di diversi soluti che ne alterano le proprietà rispetto ad una superficie in condizioni normali;
- 2) **passaggio da attacco reversibile ad irreversibile**: produzione di polimeri extracellulari da parte dei batteri e/o interazione con la superficie grazie a specifiche adesine situate all’estremità dei pili;
- 3) **sviluppo precoce della struttura del biofilm**;
- 4) **accrescimento di microcolonie nel biofilm maturo**. Anche nel corso di questa fase, continuano ad essere prodotte le

sostanze polimeriche extracellulari che si comportano da matrice adesiva e come “trappola” per i nutrienti presenti nell’ambiente circostante. Si tratta di strutture complesse, con forma simile a piedistalli, ricche di canali d’acqua e pori, nelle quali i batteri sviluppano modelli specifici di crescita, diversa fisiologia e metabolismo rispetto alle cellule planctoniche;

5) dispersione di cellule dal biofilm nell'ambiente circostante e ritorno allo stato planctonico.^[206-209]

Lo sviluppo del biofilm ed il distacco o la liberazione di cellule, singolarmente o in gruppo, può essere regolato dall’espressione genica legata alla densità di popolazione. Ciò può avvenire grazie ad una serie di “molecole segnale” inviate da cellula a cellula: le **AHL (Acylated Homoserine Lactones)** per i batteri Gram negativi ed i **peptidi specifici** per i batteri Gram positivi.^[210,211] In *Escherichia coli*, gli AHL non sono direttamente coinvolti nella formazione del biofilm, poichè questo microrganismo non è in grado di produrli. Tuttavia, esso produce la **proteina SdiA**, simile alla proteina LuxR, che è in grado di riconoscere le AHL prodotte da altre specie batteriche.

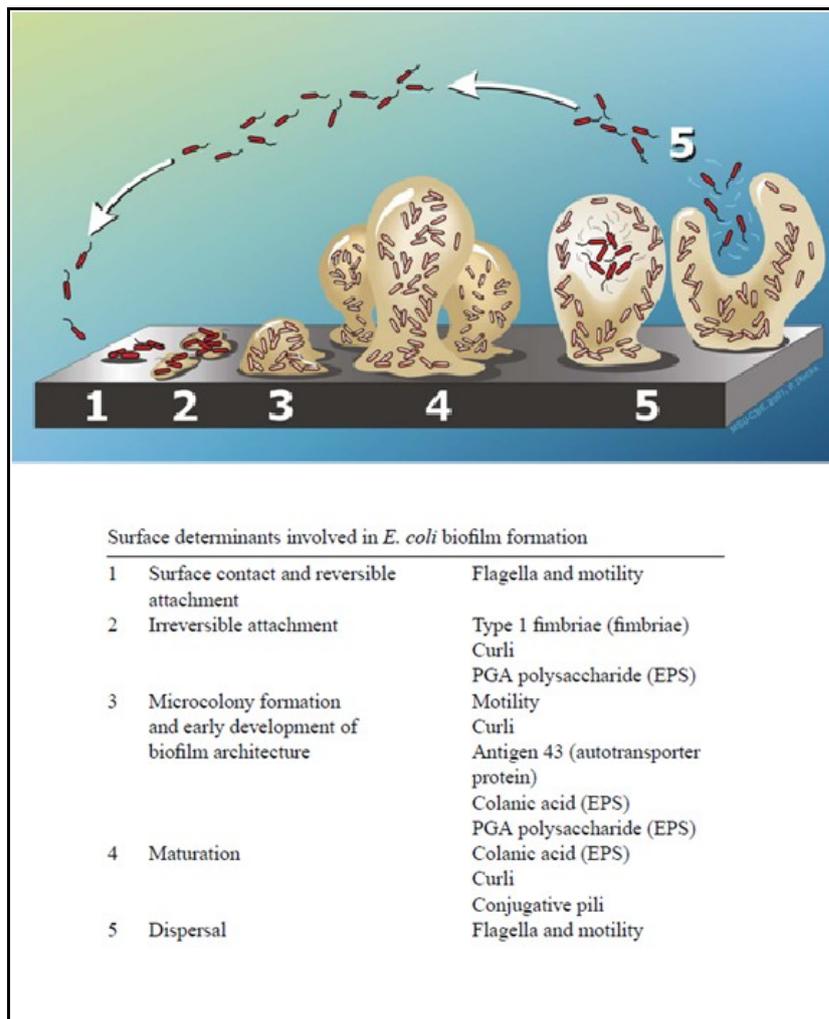


Figura 14 *Escherichia coli* e processo di formazione del biofilm

Quest'ultime, comportandosi da “molecole segnale”, possono influenzare lo sviluppo del biofilm da parte del batterio.^[212,213]

Numerosi ceppi di *E. coli* producono anche la **proteina AI-2 (Autoinducer-2)**, diffusa sia nei Gram positivi che nei Gram negativi, la cui sintesi dipende dal **gene LuxS**. AI-2 è coinvolta

nella regolazione di svariate funzioni in *E. coli*, ad esempio la produzione di flagelli e la motilità, anch'esse implicate nella formazione del biofilm.^[214,215] Diversi studi indicano che i batteri che vivono nel biofilm possono acquisire elementi genetici trasmissibili molto più velocemente degli altri, ad esempio mediante il processo di coniugazione.^[216] Questo fatto suggerisce che l'evoluzione per trasferimento orizzontale di materiale genetico, data la vicinanza fisica delle singole cellule, può avvenire rapidamente in un biofilm, rendendolo il luogo perfetto per lo sviluppo di nuovi patogeni grazie all'acquisizione di determinanti per l'antibiotico-resistenza e fattori di virulenza. Inoltre, i batteri biofilm-associati risultano più resistenti a molte sostanze tossiche come antibiotici, disinfettanti e detergenti. Le spiegazioni possono essere cercate nella minor diffusione di queste nel biofilm, nel ridotto tasso di crescita cellulare, nelle sostanze specifiche del biofilm, come l'esopolisaccaride, e negli effetti dovuti al *quorum-sensing*.^[217] Questi cambiamenti fenotipici sono il risultato di una variazione nel modello globale di espressione genica. Ciò determina il passaggio delle cellule di *E. coli* dalla forma planctonica a quella tipica del biofilm.^[218-220] Il biofilm rappresenta, dunque, una struttura complessa

che richiede comunicazione tra le cellule batteriche.^[221] I biofilm sono stati riscontrati sulla superficie di dispositivi medici per l'intubazione, cateteri, valvole artificiali cardiache, strumenti per la pulizia e "water lines".^[222] In particolare, il biofilm prodotto da *Escherichia coli* è frequentemente descritto nelle Infezioni delle Vie Urinarie croniche o da catetere, che rappresentano una delle più comuni infezioni batteriche.^[223,224] Le infezioni da UPEC interessano circa l'80% di tutte le IVU acute in ambito comunitario e nosocomiale.^[225-227] La capacità di *E. coli* di formare un biofilm contribuisce alla colonizzazione della superficie del catetere, proteggendo i batteri dal flusso meccanico dell'urina, dalle difese dell'ospite e dall'azione degli antibiotici. La formazione di biofilm si riscontra anche in caso di IVU croniche e ricorrenti, in quanto è stato recentemente dimostrato che alcuni ceppi uropatogeni possono formare strutture intracellulari simili a biofilm che fungono da "serbatoio" e che possono essere causa di infezioni ricorrenti.^[228,229] Tuttavia, poco si conosce riguardo il legame tra persistenza degli UPEC nel tratto urinario ed instaurarsi di IVU croniche e recidivanti. Di conseguenza, è necessaria una migliore comprensione dei meccanismi coinvolti nella formazione di biofilm da parte di *Escherichia coli*, così come del rapporto tra formazione del biofilm e patogenesi. Tra i fattori conosciuti

che contribuiscono alla produzione di biofilm si ricordano i flagelli, diverse classi di fimbrie, curli, antigene 43 (Ag43), i composti dell'acido colanico della matrice extracellulare, cellulosa e poli- β -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina. [224, 230-234] La regolazione dell'espressione genica che avviene nel corso delle varie fasi di formazione del biofilm è complessa e ancora poco conosciuta. L'attaccamento alla superficie e la formazione di microcolonie sembrano essere legate ad una serie di segnali che derivano dal contatto superficiale e dall'osmolarità percepite, rispettivamente, attraverso il **CpxA/CpxR** e l'**EnvZ/OmpR**. [235-240] La disponibilità di sostanze nutritive ed altri segnali di stress giocano un ruolo fondamentale nella formazione del biofilm di *E. coli*. Ad esempio, il **repressore dei cataboliti** ed il **fattore sigma alternativo RPoS** sembrano influenzare la fase di maturazione del biofilm, così come i **fattori di regolazione di H-NS, YaiC e RcsC**. [241-247] Un altro livello di controllo è dovuto all'espressione di strutture associate alla superficie cellulare che vanno incontro a variazione di fase, cioè il passaggio reversibile tra una fase "ON" ed una fase "OFF" di espressione genica, che si traduce nella variazione del livello di espressione di singole cellule appartenenti ad una certa popolazione. La variazione di fase è dovuta all'interazione tra diversi fattori regolatori. [248-251]

CAPITOLO 6

Alternative alla terapia antibiotica: “*Vaccinium macrocarpon*”

6.1 Generalità

Il *Vaccinium macrocarpon* [Fig.15], chiamato anche “**mirtillo rosso americano**” o “*cranberry*”, è una pianta nativa del Nord America. Il succo ottenuto dal suo frutto è stato impiegato, a partire dalla fine degli anni '20, come rimedio medicinale per diverse patologie, tra cui la cistite.^[252]



Figura 15 *Vaccinium macrocarpon*

Il suo utilizzo nelle malattie urinarie è stato progressivamente ridotto nel tempo e quasi abbandonato con la comparsa dei sulfamidici, prima, e degli antibiotici, in seguito. Recentemente, è stato valorizzato l'impiego medicinale dei derivati di questa pianta (frutto, succo disidratato ed estratto), soprattutto nei confronti delle infezioni vescicali e delle manifestazioni cliniche ricorrenti. Da un punto di vista molecolare il frutto, come il succo disidratato e l'estratto, contiene almeno due strutture chimiche di interesse medicinale: *acidi organici* e *antocianidine*. Il catabolismo dei primi sembrerebbe incrementare i livelli urinari di acido ippurico, con conseguente acidificazione delle urine. Tra le seconde, particolare rilievo hanno le **proantocianidine**, strutture dimeriche da molti Autori indicate come vero e proprio principio attivo capace di limitare l'adesività, quindi la capacità proliferativa dei patogeni, con particolare riferimento ad *Escherichia coli*.^[253] Le **proantocianidine (PAC)** o **tannini concentrati di tipo A** appartengono alla famiglia dei polifenoli. Alcuni frutti, il thé ed il caffè contengono PAC, meglio conosciuti col nome di OPC (oligoproantocianidine), e sono caratterizzati da un singolo legame: non possiedono, dunque, alcuna capacità antiadesiva batterica. Il cranberry è un frutto unico in quanto possiede un'elevata quantità di PAC di tipo A, le sole

componenti che possiedono un'attività antiadesiva, riconosciuta come coadiuvante nella riduzione delle cistiti e delle prostatiti. Alcuni studi hanno anche dimostrato che le proprietà antiadesive delle PAC contenute nel cranberry sono valide per tutti i ceppi di *E. coli*, resistenti o meno agli antibiotici.^[254-259]

6.2 Ipotesi sul meccanismo d'azione

Le principali ipotesi sui possibili meccanismi di azione del cranberry nel controllo delle cistiti batteriche sono due. La prima ipotesi è che l'acido quinico (acido organico presente nel frutto), aumentando l'escrezione nelle urine di acido ippurico, determini una moderata attività antibatterica tramite l'acidificazione delle urine. Numerosi ceppi batterici, infatti, presentano difficoltà di sviluppo ad un basso valore di pH. Tuttavia, diversi studi hanno recentemente invalidato questa teoria, non rilevando *in vivo* cambiamenti significativi o, al massimo, solo variazioni transitorie nella concentrazione di acido ippurico nelle urine, insufficienti a creare una acidità urinaria stabile e significativa. La seconda ipotesi, che attualmente sembra avere maggiori conferme in letteratura, sostiene che le proantocianidine abbiano la capacità di inibire l'adesione di batteri patogeni alla mucosa vescicale,

impedendo quindi lo sviluppo e la progressione dell'infezione. Senza adesione, i batteri hanno una ridotta capacità proliferativa nel tratto urinario e vengono escreti con maggiore facilità, non riuscendo quindi a determinare un'infezione clinicamente significativa. Le **proantocianidine di tipo A2** sembrano essere le principali responsabili dell'attività antisettica, che si manifesta in maniera irreversibile per interazione diretta sulle fimbrie di *Escherichia coli*. In particolare, si è verificato come tale batterio aderisca alla membrana delle cellule uro-epiteliali per mezzo di strutture proteiche, chiamate adesine, localizzate all'estremità distale di sottili filamenti (fimbrie) che si proiettano dalla parete del batterio. Le fimbrie P (galattosio specifiche) si legano ad un disaccaride del galattosio, α -D-Gal(1,4)- β -D-Gal, presente sulla superficie delle cellule uro-epiteliali. Le proantocianidine, grazie all'elevata affinità che hanno per le fimbrie P, impediscono tale legame determinando l'eliminazione del microorganismo.^[260]

6.3 Profilo di sicurezza

Il cranberry, in generale, presenta un alto profilo di sicurezza. Nello studio di tossicità orale acuta nel ratto, la DL50 dell'estratto standardizzato di cranberry è risultata maggiore di 4000 mg/kg. Essendo inoltre una pianta per uso alimentare, il cranberry ed i suoi derivati vengono considerati sicuri per un eventuale uso terapeutico nell'uomo.

Tra i pochi e rari possibili effetti collaterali, è stata individuata la possibilità di indurre o peggiorare una sintomatologia a livello gastrico, con un'incidenza però quasi aneddotica. Si tengono in considerazione alcune segnalazioni secondo le quali la somministrazione del succo e/o dell'estratto di *Vaccinium macrocarpon* nei pazienti che assumono anticoagulanti, in particolar modo il *warfarin*, dovrebbe essere quanto meno monitorata e non trascurata. Infatti, alcune pubblicazioni hanno posto l'attenzione su un evidente incremento del valore basale di INR (attività protrombinica) in pazienti in corso di trattamento. Questi dati non trovano però riscontro in studi randomizzati e in doppio cieco. Potrebbe, comunque, essere ragionevole procedere con prudenza nell'associazione di questi due prodotti, monitorando i parametri dei pazienti tenendo in considerazione le segnalazioni in *casereport* di fenomeni emorragici.^[261]

6.4 Attività clinica dei derivati

In letteratura sono riportati molti lavori che hanno posto l'attenzione sull'efficacia del cranberry nelle Infezioni delle Vie Urinarie. L'interesse, infatti, è andato crescendo a causa della diminuzione di efficacia di numerosi antibiotici e degli effetti collaterali che possono generarsi a causa del loro eccessivo utilizzo. Purtroppo, le pubblicazioni cliniche significative sono limitate. Nell'ambito delle UTI è possibile, comunque, reperire alcuni studi clinici recenti ben eseguiti e finalizzati a verificare la capacità del *Vaccinium macrocarpon* nel ridurre l'incidenza delle infezioni urinarie. In particolare, in una recente meta-analisi, alcuni Autori hanno valutato tutti i lavori pubblicati riconducibili a *trial* controllati ed effettuati con criteri scientifici verificabili, in cui fossero presenti tutti i dati richiesti per l'analisi. Su 10 studi selezionati, per un totale di 1049 pazienti (6 realizzati con succo disidratato e 4 con estratto secco), solo quattro sono stati ritenuti validi per l'elaborazione. L'esito della meta-analisi ha dimostrato che esiste evidenza che il cranberry riduca significativamente il numero delle infezioni urinarie sintomatiche, in modo particolare nelle donne che soffrono di cistite ricorrente. Il problema principale e comune che si è riscontrato negli studi ad oggi realizzati, sembra essere l'assenza di corretta standardizzazione e

titolazione del derivato utilizzato. Da questo punto di vista, tale incertezza riduce la validità dei risultati clinici ottenuti. Nella meta-analisi della Cochrane Collaboration, sono stati tenuti in considerazione i lavori che si basavano su un disegno sperimentale in doppio cieco vs placebo. Inoltre, il preparato impiegato risultava essere altamente standardizzato in proantocianidine. Si è fatto riferimento agli studi pubblicati dal 1994 fino al 2005 e, tra questi, si ricordano:

- 1) lo **studio di Bailey**, condotto su 12 donne con cistite recidivante. Gli Autori conclusero che la cistite ricorrente poteva essere controllata da una preparazione di cranberry ad alto contenuto in polifenoli. Il limite dello studio era dovuto al numero limitato di pazienti arruolati;
- 2) lo **studio NAPRUTI**, condotto su 280 donne, anch'esse con cistite ricorrente. In esso, era stato confrontato l'uso del cranberry con la terapia antibiotica classica. Gli Autori sostennero la non inferiorità dell'attività profilattica, dovuta all'uso di estratto di cranberry, nel ridurre le recidive infettive rispetto alla somministrazione di antibiotico;
- 3) lo **studio di Hess**, condotto su 57 pazienti con vescica neurologica da trauma spinale, in cui gli Autori notarono che la frequenza delle UTI era stata ridotta da 1.0 casi per anno a 0.3 concludendo, così, che l'estratto

secco di cranberry poteva essere efficace anche nei pazienti paraplegici;

- 4) lo **studio di Wing**, condotto su 188 donne in gravidanza, nel quale si concluse che il cranberry presentava attività protettiva nei confronti delle cistiti sia asintomatiche che sintomatiche.^[262-265]

CAPITOLO 7

PARTE SPERIMENTALE

7.1 Scopo dello studio

Alcuni recenti studi hanno dimostrato la correlazione tra consumo di cranberry e prevenzione delle Infezioni delle Vie Urinarie.^[266] Il cranberry è costituito da una complessa miscela di acidi organici, vitamina C, flavonoidi ed antocianidine.^[267] Le antocianidine e proantocianidine sono polifenoli con spiccata attività antiossidante ed antiradicalica e, nelle piante, si comportano da sistemi di difesa dai microrganismi. L'efficacia antinfettiva del cranberry è stata correlata all'abilità delle proantocianidine nel ridurre l'adesione batterica alle cellule uro-epiteliali.^[268-271] Lo scopo del mio lavoro di ricerca è stato quello di valutare l'attività inibente di un integratore in compresse contenente 120 mg di cranberry (36 mg di proantocianidine e 60 mg di acido ascorbico) sull'adesività di *Escherichia coli* uropatogeni (UPEC) nei confronti di cellule uro-epiteliali umane, in urine di donne sane, paragonandone l'attività con un placebo. Gli UPEC rappresentano i microrganismi maggiormente isolati nelle Infezioni delle Vie Urinarie e l'azione anti-adesiva dell'estratto di cranberry previene l'adesione e colonizzazione di tali batteri sulle superfici mucose della vescica.

7.2 Materiali e metodi

Questo studio clinico monocentrico, in doppio cieco, cross-over, con randomizzazione stratificata, è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale SS. Salvatore di Paternò (CT) e condotto nel Reparto di Ginecologia ed Ostetricia dello stesso nosocomio. Sono state arruolate 24 donne di età compresa tra i 18 e i 65 anni, suddivise in due gruppi: 12 volontarie sane con anamnesi negativa per cistiti ricorrenti e 12 donne con storia positiva per cistiti ricorrenti (3-5 episodi di cistite non complicata nei 12 mesi precedenti l'inizio dello studio). Tutte le pazienti, all'arruolamento, hanno firmato il consenso informato e sono stati tenuti in considerazione i seguenti criteri di esclusione:

- trattamento antibiotico nelle due settimane precedenti l'arruolamento;
- eventuali infezioni in corso al tratto urinario;
- gravidanza;
- trattamento con antagonisti della vitamina K;
- eventuale presenza di calcoli renali;
- condizioni che potessero interferire con la *compliance* al trattamento e alle procedure previste.

Le pazienti sono state sottoposte in totale a 5 visite [Tab. 6]. Nella **visita 1** è stata raccolta l'anamnesi per valutare i criteri di inclusione, effettuato un esame clinico obiettivo e raccolto un campione di urine per sottoporlo ad urinocoltura. I campioni sono stati recapitati al Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche dell'Università degli Studi di Catania, presso il quale sono stati sottoposti ad analisi approfondite. Le pazienti risultate positive all'urinocoltura sono state escluse dal progetto di ricerca e sostituite con altre che avessero i requisiti necessari. Nel corso della **visita 2**, è stato assegnato un numero di randomizzazione corrispondente ad una delle due sequenze di trattamento (farmaco o placebo) e raccolto un ulteriore campione di urine per la valutazione dell'indice di adesività basale del I periodo. I kit, distribuiti casualmente alle pazienti, erano identici nel contenuto e le capsule al loro interno uguali sia nell'aspetto che nel gusto. Dopo tale visita, le pazienti hanno assunto per via orale il prodotto tutte le sere per 7 giorni consecutivi. Il mattino successivo all'ultima somministrazione è stata effettuata la **visita 3**, nel corso della quale è stato raccolto un altro campione di urina per la valutazione dell'indice di adesività dopo il primo periodo di trattamento. Dopo una settimana di *wash out* è stata effettuata la **visita 4**, nella quale è

stato raccolto un campione di urina per urinocoltura e per la valutazione dell'indice di adesività basale del II periodo ed è stato consegnato il secondo kit col trattamento. Anche in questo caso, le pazienti hanno assunto il prodotto tutte le sere per 7 giorni consecutivi. Il mattino successivo all'ultima somministrazione è stata effettuata la **visita 5**, durante la quale è stato raccolto un campione di urina per la valutazione dell'indice di adesività dopo il secondo periodo di trattamento.

24 DONNE (18→65 ANNI) 12 volontarie sane 12 volontarie positive per cistiti ricorrenti	
Visita 1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Raccolta anamnesi; ▪ esame clinico obiettivo; ▪ raccolta campione urine per urinocoltura.
Visita 2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Assegnazione numero di randomizzazione (farmaco e placebo); ▪ raccolta campione urine per valutazione indice di adesività basale del I periodo; ▪ consegna casuale kit identici.
<i>Assunzione prodotto (via orale) per 7 sere consecutive</i>	
Visita 3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Raccolta campione urine per valutazione indice di adesività dopo il I periodo di trattamento.
<i>Una settimana di "wash out"</i>	
Visita 4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Consegna secondo kit di trattamento; ▪ raccolta campione urine per urinocoltura e valutazione indice di adesività del II periodo.
<i>Assunzione prodotto (via orale) per 7 sere consecutive</i>	
Visita 5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Raccolta campione urine per valutazione indice di adesività dopo il II periodo di trattamento.

Tabella 6 Visite effettuate nel corso dello studio

Urinocoltura

L'esame colturale delle urine è l'accertamento microbiologico maggiormente richiesto nella routine diagnostica di un Laboratorio Clinico. La diagnosi di Laboratorio delle infezioni urinarie (UTI) si basa sull'identificazione di batteri e leucociti. Lo standard diagnostico è costituito dall'esame colturale che non solo permette di quantificare la carica microbica ma anche di identificare l'agente eziologico ed ottenere un antibiogramma per condurre un'adeguata terapia.^[272,273] L'urina, in condizioni normali, risulta sterile. Per tale motivo, è importante che la raccolta del campione avvenga dopo un'accurata pulizia dei genitali e dal mitto intermedio per evitare contaminazioni da germi uretrali. Nel 95% dei casi, l'infezione delle vie urinarie è causata da un'unica specie batterica e, se dovessero esserne isolate due o più, bisogna sospettare un'eventuale contaminazione dell'urina raccolta.^[274] I campioni di urina pervenuti in laboratorio sono stati seminati su opportuni terreni di coltura per l'isolamento di eventuali patogeni urinari. Per la conta batterica è stato utilizzato il terreno di coltura CLED AGAR (Becton Dickinson). 100 µl di una diluizione 10^{-2} del campione di urine è stata seminata a tutta piastra utilizzando un'ansa calibrata. L'incubazione è avvenuta alla temperatura di

35±2°C per 24-48h e, in seguito, è stata effettuata la conta batterica.^[275] Per l'interpretazione dei risultati, si è tenuto conto del criterio di Kass. Quest'ultimo stabilisce che un'urinocoltura può essere considerata patologica allorchè presenti un valore di carica batterica $\geq 10^5$ CFU/ml. Tuttavia, il riscontro di un valore inferiore, ma di germi che non rappresentino la flora batterica saprofitica intestinale, deve essere tenuto in considerazione. Concentrazioni più basse di germi provenienti dal tratto gastro-intestinale possono essere considerate significative in presenza di sintomatologia: è stato citato come valore soglia almeno 10^2 CFU/ml di una singola specie di uropatogeno delle donne, 10^3 CFU/ml nell'uomo e 10^2 CFU/ml in un campione di urine ottenuto con puntura sovrapubica. Questi criteri hanno una specificità di circa l'85% ed una sensibilità del 95%. In più dell'80% dei pazienti con pielonefrite è presente una batteriuria superiore a 10^5 CFU/ml, mentre in solo la metà delle donne sintomatiche con Infezioni delle Vie Urinarie si evidenzia una tale concentrazione: la maggior parte, infatti, presenta una conta batterica compresa tra 10^2 e 10^5 CFU/ml. Svariati possono essere i motivi dell'associazione tra la bassa conta batterica e la sintomatologia urinaria acuta in giovani donne:

- l'abbondante introito idrico e le minzioni frequenti;

- l'azione battericida, in vivo, da parte delle cellule della mucosa vescicale;
- l'eventuale presenza di inibitori nelle urine.^[274]

I campioni sono anche stati seminati su terreni di coltura selettivi e cromogeni (OXOID) per l'isolamento e differenziazione di eventuali specie batteriche presenti nelle urine. Sono stati utilizzati:

Bile Aesculin Agar: terreno per l'isolamento di enterococchi e streptococchi di gruppo D. Tali batteri sono in grado di idrolizzare l'esculina, formando esculetina e destrosio. L'esculetina, a sua volta, si combina col citrato ferrico presente nel terreno formando un sedimento marrone-scuro o nero che è indicativo di reazione positiva. La bile, invece, inibisce la crescita degli altri batteri Gram-positivi [Fig. 16].

Eosin Methylene Blue Agar: terreno d'isolamento per l'identificazione delle Enterobacteriaceae. Questo versatile terreno di coltura, modificato da Levine, è usato in particolare per la differenziazione di *Escherichia coli* (verde metallico) ed *Enterobacter aerogenes* (viola), per l'identificazione rapida di *Candida albicans* e per l'isolamento degli stafilococchi coagulasi-positivi. Esso è preparato a partire dalla formula specificata dall'APHA, per l'identificazione e differenziazione del gruppo dei coliformi [Fig. 17].

MacConkey Agar: terreno selettivo che consente la distinzione tra coliformi e batteri non-fermentanti il lattosio, con inibizione della crescita dei micrococchi Gram positivi [Fig. 18].

Mannitol Salt Agar: terreno di coltura per l'isolamento degli stafilococchi patogeni. Esso inibisce la crescita di molte specie batteriche, ad eccezione dei batteri alofili [Fig. 19].

CHROMagar Candida (Becton Dickinson): terreno di coltura cromogeno per l'identificazione dei dermatofiti, funghi e lieviti [Fig. 20].

Chromogenic UTI medium: terreno cromogeno per l'identificazione, differenziazione e conta dei principali microrganismi responsabili di infezioni del tratto urinario [Fig. 21].

Tutti i terreni di coltura, opportunamente pesati e disciolti in acqua distillata, sono stati sottoposti a sterilizzazione in autoclave a 121° per 15 minuti.

L'incubazione, per la crescita batterica, è avvenuta alla temperatura di 35±2°C per 18-24h in aerobiosi.^[276-278]

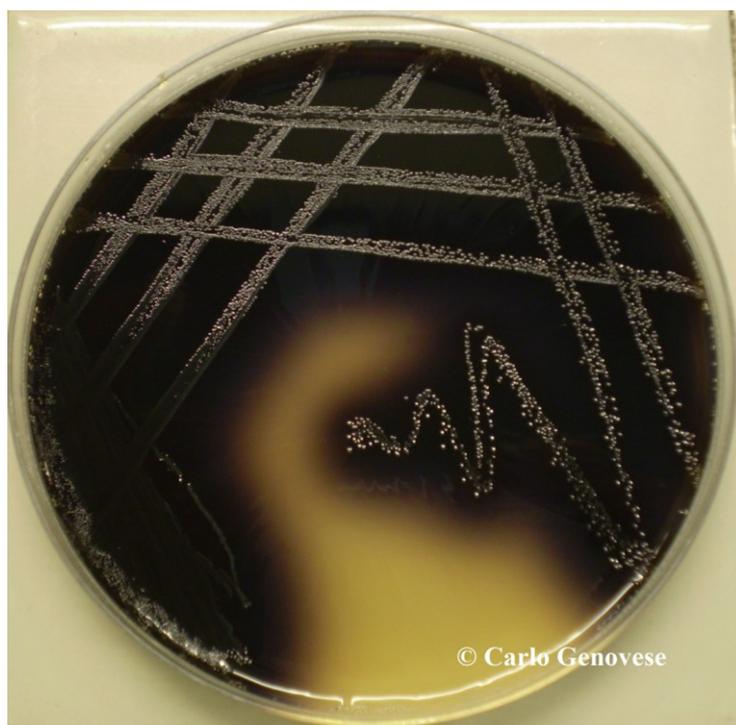


Figura 16 *Enterococcus spp.* su Bile Aesculin Agar

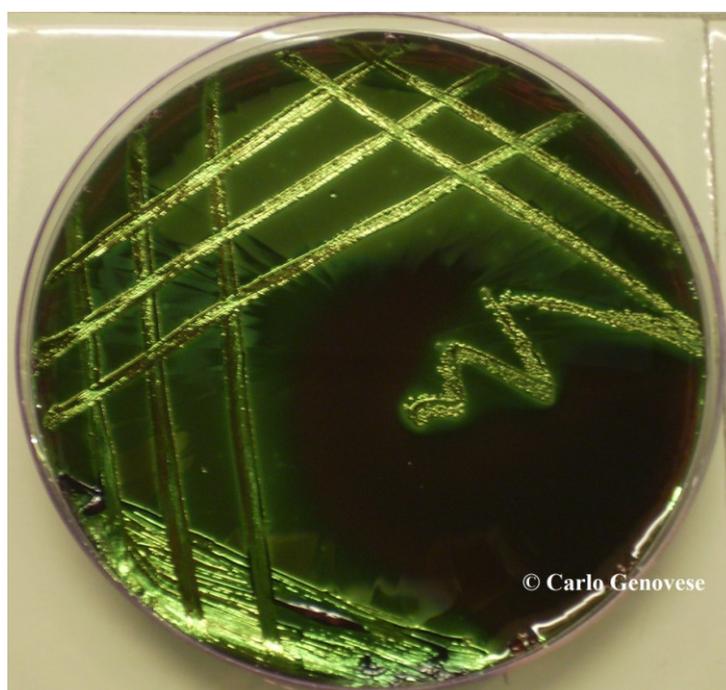


Figura 17 *Escherichia coli* su Eosin Methylene Blue Agar



Figura 18 *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* su MacConkey Agar



Figura 19 *Staphylococcus aureus* su Mannitol Salt Agar



Figura 20 *Candida spp.* su CHROMagar Candida

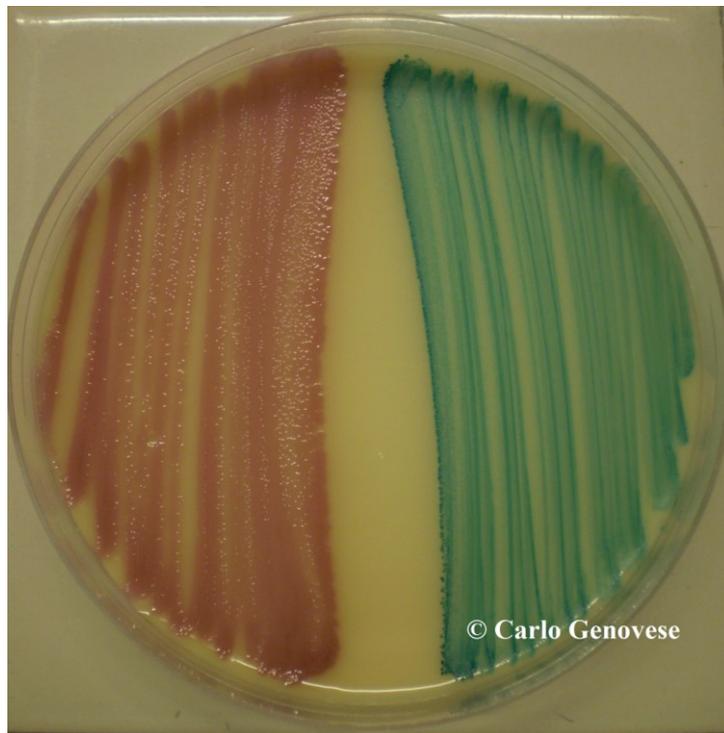


Figura 21 *Escherichia coli* ed *Enterococcus spp.* su Chromogenic UTI medium

Analisi delle urine

L'esame delle urine ha consentito di valutare diversi aspetti della funzionalità renale e la presenza di eventuali patologie a carico dell'apparato urinario. Sono state effettuate l'analisi chimico-fisica del campione urinario e l'analisi microscopica del sedimento urinario.

Analisi chimico-fisica delle urine

L'analisi chimico-fisica delle urine è stata resa possibile grazie all'utilizzo di strisce reattive (Carlo Erba). Sono stati valutati i seguenti parametri:

- **colore e aspetto:** le urine, in condizioni normali, si presentano limpide e di colore paglierino. Il colore, in base alla concentrazione dei soluti, può essere: pallido (eccessiva introduzione di liquidi, poliuria tubulare, diabete insipido, diabete mellito); torbido/opaco (infezioni batteriche, cristallizzazione di sali); rosse o scure (ematuria, mioglobinuria, presenza di bilirubina, di protoporfirine, coloranti vegetali, farmaci). In caso di proteinuria elevata, possono apparire schiumose;
- **pH:** in condizioni normali, i valori oscillano tra 4,5 ed 8,0. Un incremento dell'acidità delle urine può essere considerato fisiologico

(digiuno prolungato, dieta iperproteica, esercizio muscolare) o patologico (gotta, emopatie, farmaci uricosurici, farmaci acidificanti). Anche l'incremento dell'alcalinità può essere fisiologico (diete vegetariane) o patologico (alcalosi metabolica, infezioni da germi ureasi-positivi, insufficienza renale cronica, deficit tubulari);

- **peso specifico:** il peso di una certa quantità di urine viene confrontato con quello dell'acqua distillata e varia da 1000 a 1050, a seconda del riassorbimento di acqua e sodio a livello renale. Dunque, è indice di funzionalità del sistema di concentrazione e diluizione;
- **proteine:** la determinazione della proteinuria si effettua grazie all'utilizzo di strisce reattive impregnate con un colorante, il blu di tetrabromofenolo. In base alle caratteristiche specifiche delle proteine escrete nelle urine, si possono distinguere diverse tipologie di proteinurie, che rispecchiano differenti quadri clinici funzionali e patologici:
 - a) fisiologica: <30mg/24h (30% albumina, 70% β -globuline e proteine di Tamm-Horsfall). Non viene rilevata dallo stick;

- b) microalbuminuria: escrezione di albumina compresa tra 30 e 300 mg/24h;
 - c) glomerulare: da 300mg/die a diversi grammi. È dovuta ad alterazione a livello glomerulare;
 - d) tubulare: <1000 mg/24h (capacità massima di riassorbimento tubulare). Proteine a basso peso molecolare (11.800-18.000), filtrate dal glomerulo;
 - e) selettiva: proteine a basso peso molecolare (70.000-90.000; albumina, β -globuline e transferrina);
 - f) non selettiva: presenza di tutte le proteine plasmatiche, comprese le γ -globuline (peso molecolare compreso tra 11.800-18.000).
- **sangue**: anche per l'ematuria, vengono utilizzate le strisce reattive. Solitamente, sulla striscia si produce una positività a chiazze se sono presenti eritrociti intatti ed una positività omogenea se vi è emoglobina libera. Pertanto un test positivo indica:
 - a) ematuria: alterazione della filtrazione renale;
 - b) emoglobinuria: presenza di anemie emolitiche.
 - **glucosio**: in condizioni fisiologiche è assente. Si riscontra in caso di aumentati valori plasmatici di glucosio (diabete di tipo 1 o 2) o di

ridotto Tm di glucosio (tubulopatie);

- **corpi chetonici:** si riscontrano in caso di digiuno o vomito prolungato (iperemesi da gravidanza) e nella chetoacidosi;
- **bilinogeno e pigmenti biliari:** sono indice di epatopatia o ostruzione dei dotti biliari. In caso di presenza del solo bilinogeno, si tratta di possibile anemia emolitica;
- **nitriti/esterasi leucocitaria:** i batteri urinari sono in grado di convertire i nitriti in nitrati, che vengono rilevati dalle strisce reattive per formazione di una colorazione rosa. L'esterasi leucocitaria si libera per lisi dei granulociti urinari. Pertanto, entrambe le reazioni evidenziano la presenza di infezioni a carico delle vie urinarie.^[279]

Analisi del sedimento urinario

Per l'analisi del sedimento urinario, 10 ml di urine fresche sono state depositate in un tubo conico e centrifugate a 1500 r.p.m. per 5 minuti. Quindi, 9 ml di surnatante sono stati prelevati con una pipetta pasteur sterile. Dopo agitazione della provetta (contenente 1 ml di centrifugato), sono stati prelevati 40 µl, con una pipetta automatica e puntale sterile, e depositati su un vetrino sul quale è stato posto un vetrino coprioggetto. L'osservazione del vetrino a fresco e dei relativi campi [Fig. 22] è stata effettuata al microscopio ottico, utilizzando obiettivi 25X e 40X.^[280] Le cellule di sfaldamento dell'epitelio urinario si riscontrano in condizioni fisiologiche. In condizioni patologiche, invece, sono presenti elementi corpuscolati (emazie e leucociti) e cilindri (costituiti da uromucoide). Dal punto di vista prettamente morfologico, si distinguono diversi tipi di cilindri:

- ialini: costituiti solo da uromucoide, acellulari e non patologici;
- cerei/grassosi: costituiti da proteine e lipidi, indicativi di sindrome nefrosica;
- epiteliali: contenenti cellule dell'epitelio tubulare;
- leucocitari: contenenti granulociti;

- eritrocitari: contenenti emazie intere ed indicativi di glomerulonefrite;
- granulosi: derivati dalla degenerazione di cilindri ricoperti da cellule (epiteliali, leucocitari o ematici). Si riscontrano spesso nella patologia del parenchima renale e la loro quantificazione e progressione sono importanti nella diagnosi e nel follow-up.

L'esame microscopico del sedimento comprende anche la valutazione della presenza di cristalli (acido urico, urati amorfi, ossalati, fosfati) che possono fornire indicazione, in presenza di calcolosi urinaria, per meglio definire le componenti del calcolo. L'esame citologico urinario, invece, è sfruttato per la diagnosi di malattie infiammatorie e neoplastiche dell'apparato urinario.^[279]

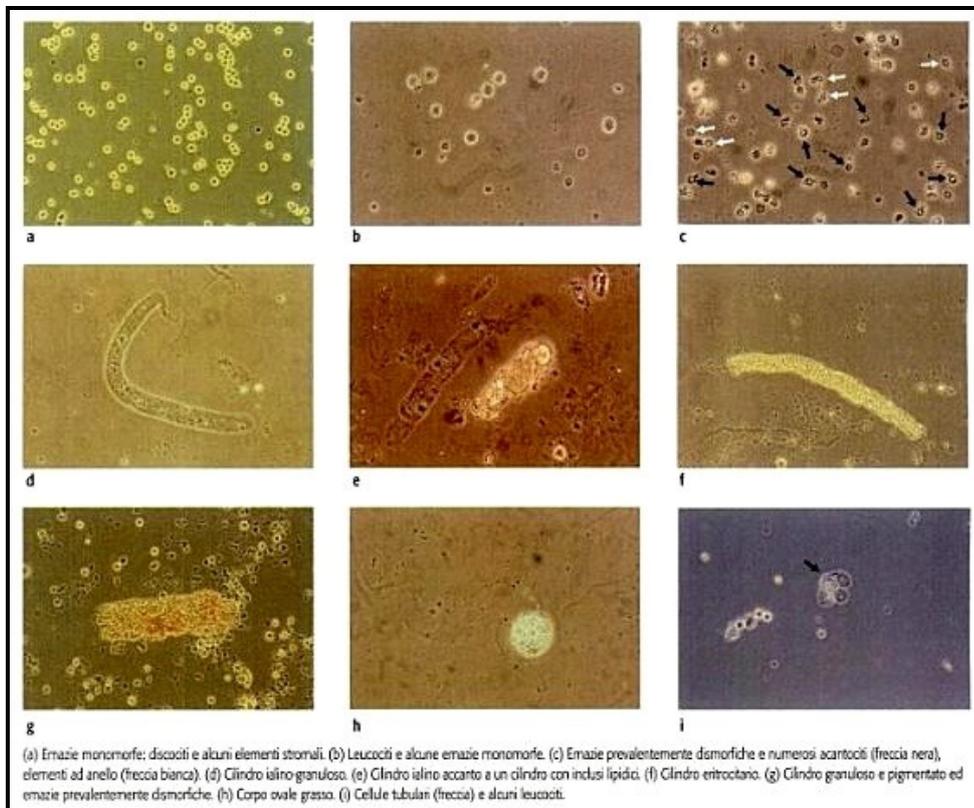


Figura 22 Analisi sedimento urinario

Antibiogramma

L'antibiogramma, o metodo di Kirby-Bauer, è tra i più utilizzati nel saggio della sensibilità dei batteri ai farmaci antimicrobici. Una piastra di Petri, contenente terreno agarizzato, è stata inoculata in maniera uniforme, sulla sua intera superficie, con una quantità standardizzata del microrganismo da saggiare. La sospensione batterica è stata preparata in acqua fisiologica (0,9% NaCl) ad una concentrazione pari allo 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Quindi, sulla superficie dell'agar, sono stati depositi dei dischetti di carta da filtro impregnati con concentrazioni note dell'agente antimicrobico (OXOID). Durante l'incubazione il farmaco, diffondendo dal dischetto all'agar, creava un gradiente di concentrazione: più ci si allontana dal dischetto, minore sarà la concentrazione del farmaco. Nel caso in cui l'agente antimicrobico risultava efficace, dopo un periodo d'incubazione compreso tra le 18-24h alla temperatura di $35 \pm 2^\circ\text{C}$, si formava attorno al dischetto una zona di inibizione della crescita microbica [Fig. 23]. Il diametro di tale zona è stato, quindi, sottoposto a misurazione espressa in mm. Il diametro della zona di inibizione è stato confrontato con una tabella di riferimento per ogni singolo farmaco e per le diverse concentrazioni, e il microrganismo è stato definito sensibile, intermedio o resistente. Le

procedure sono state eseguite nel rispetto delle linee guida proposte dal Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). I “valori di breakpoint” sono condizionati da proprietà, diverse per ogni antibiotico, che influenzano la migrazione a partire dal dischetto e che determinano la formazione dell’alone di inibizione. Tali proprietà sono:

- a) peso molecolare: un antibiotico che presenta peso molecolare maggiore tenderà a migrare con più difficoltà dal dischetto rispetto ad un altro con peso molecolare minore;
- b) forma della molecola: un antibiotico la cui struttura chimica è più compatta migrerà più lontano rispetto ad un altro che possiede struttura meno compatta per la presenza di catene laterali e che, di conseguenza, incontrerà maggiore difficoltà a passare attraverso le “maglie” dell’agar che costituiscono il terreno;
- c) cariche elettriche: poiché l’agar è ricco di ioni SO_4^- , un antibiotico che in soluzione tende a caricarsi positivamente tenderà a legarsi subito agli ioni solfato e a migrare con maggiore difficoltà; di contro, un antibiotico che si carica negativamente non subirà tale effetto e migrerà con più facilità. Da ciò si deduce che non è corretto attribuire una maggiore efficacia ad un antibiotico con alone di inibizione più grande rispetto ad

un altro antibiotico, appartenente ad una famiglia diversa, con alone di dimensione inferiore. Questo perché un alone maggiore può essere segno di una maggiore facilità di migrazione in senso centrifugo. Il paragone tra gli aloni di inibizione è consentito solo tra antibiotici di uno stesso gruppo, che avranno piccole ed accettabili differenze nel peso molecolare, nella forma della molecola e nelle cariche elettriche.^[281-283]



Figura 23 Antibiogramma su *Pseudomonas spp.*

Studio dell'adesività batterica

Lo studio *in vitro* dell'adesività batterica è stato effettuato utilizzando un adattamento del metodo di Di Martino *et al.* Ogni campione di urine è stato centrifugato a 3000 r.p.m. per 10 minuti, sottoposto a filtrazione sterilizzante (0,45 µm) e conservato alla temperatura di -20°C. I test di adesività sono stati realizzati grazie all'utilizzo di cellule umane HT1376 da carcinoma della vescica. Per la coltura cellulare, sono state utilizzate micropiastre a 24 pozzetti, riempite con Minimal Essential Medium (MEM) addizionato con siero bovino fetale al 10%, glutamina 2 Mm e 100 µg/ml di *streptomycina*, ed incubate alla temperatura di 37°C. Le cellule, prima di essere infettate, sono state lavate con Phosphate Buffered Saline (PBS) per rimuovere le tracce di antibiotico presenti nel terreno di coltura. Sono stati utilizzati due ceppi ATCC (American Type Culture Collection): *E. coli* ATCC 25922 ed *E. coli* ATCC 35218. Entrambi esprimono sia le fimbrie P che quelle di tipo 1. I batteri sono stati messi in coltura nei campioni di urina, addizionati con il 5% di Luria-Bertani Broth (LB), ed incubati per 36 h. In seguito, i ceppi batterici sono stati raccolti mediante centrifugazione e risospesi in MEM ad una concentrazione pari allo 0.5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Così preparate, le sospensioni batteriche sono state messe a

contatto con le cellule uroepiteliali ed incubate a 37°C per 3 h. Dopo aver effettuato 3 lavaggi con PBS, le cellule sono state fissate con metanolo, colorate con Giemsa al 10% ed esaminate al microscopio per la conta batterica [Fig. 24]. È stato così possibile determinare l'indice di adesività, ovvero il numero medio di batteri adesi per cellula risultante dall'esame di 100 cellule. Ogni test è stato ripetuto 3 volte.^[284,285]

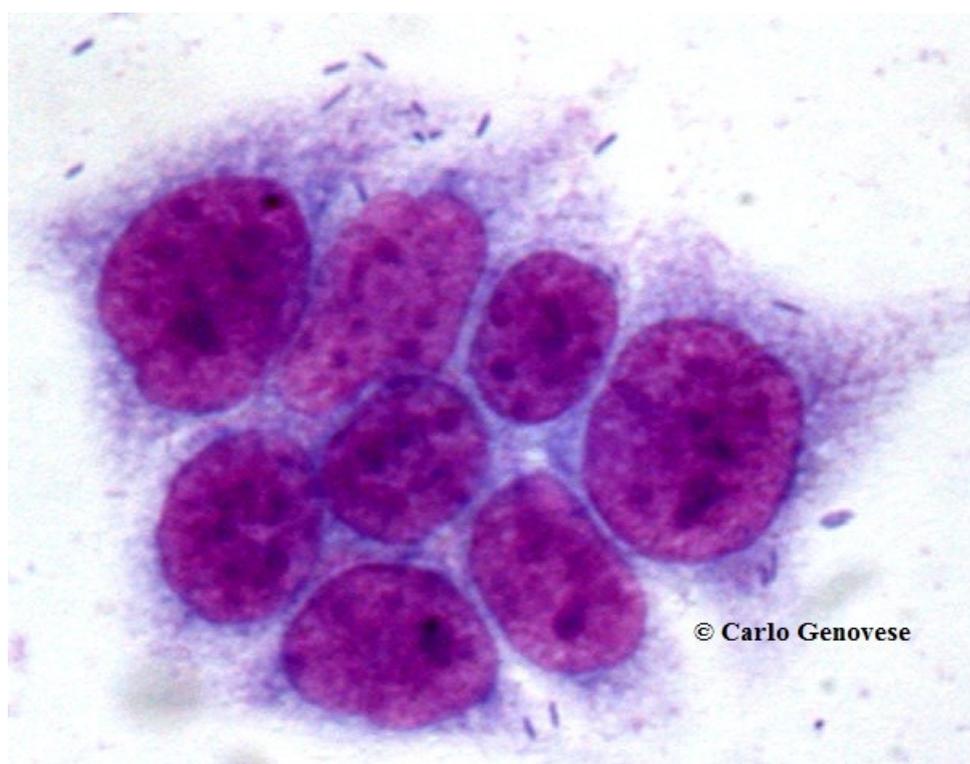


Figura 24 Cellule HT1376 al microscopio dopo colorazione

7.3 Risultati

Le 24 pazienti arruolate per lo studio sono donne caucasiche di età compresa tra i 20 e i 57 anni, 12 delle quali con storia di cistiti ricorrenti. Il placebo non ha mostrato alcun effetto rilevante in nessun gruppo e in nessun periodo di trattamento. Al contrario, i valori di adesività batterica ottenuti dalle urine delle donne che avevano assunto l'integratore contenente mirtillo hanno mostrato una significativa riduzione in entrambi i gruppi. Le medie degli indici di adesività alla fine del trattamento, infatti, sono state **2.89** per i soggetti che hanno assunto il mirtillo e **5.83** per il placebo. Analoghe differenze si sono osservate esaminando separatamente i due gruppi: **3.02** contro **5.85** nel gruppo delle volontarie sane e **2.77** contro **5.82** nel gruppo delle donne con cistiti ricorrenti [Tab. 7].

	No history of recurrent cystitis		history of recurrent cystitis	
	cranberry extract	placebo	cranberry extract	placebo
Mean	3.02	5.85	2.77	5.82
SD	0.72	0.98	0.31	0.97
Median	2.83	5.62	2.70	5.55
Min - Max	2.33 – 4.97	4.60 – 7.83	2.43 – 3.58	4.67 - 7.90

Tabella 7 Media degli indici di adesività di cranberry vs placebo

Comparando i risultati dell'intera popolazione, in base alle due sequenze di trattamento, l'indice di adesività è risultato **3.07** del mirtillo contro **5.73** del placebo nel I periodo di trattamento e **2.69** contro **5.92** nel II periodo di trattamento. Le stesse differenze si sono riscontrate nei due gruppi separati, paragonando i risultati in base alle due sequenze di trattamento: **3.32** contro **5.36** nel I periodo e **2.60** contro **6.20** nel II periodo per il gruppo delle volontarie sane [Graf. 4]; **2.78** contro **6.05** nel I periodo e **2.76** contro **5.60** nel II periodo per il gruppo delle donne con cistiti ricorrenti [Graf. 5]. Per quanto riguarda le volontarie sane, sia nel primo che nel secondo periodo di trattamento, i valori dell'adesività batterica basali e quelli misurati dopo la settimana di somministrazione, ottenuti dalle urine delle donne che hanno assunto il placebo, non hanno mostrato variazioni di rilievo. Al contrario, i valori dell'adesività batterica ottenuti dalle urine delle donne che hanno assunto l'integratore hanno mostrato una riduzione significativa ($P<0.001$). In particolare, nel primo periodo si è avuta una riduzione del **47.5%** tra il basale e la settimana di somministrazione, mentre nel secondo del **52.3%**. Per le pazienti con storia positiva per cistiti ricorrenti, non si è evidenziata alcuna riduzione dei valori rispetto alle donne che hanno assunto il placebo. Si è avuta, invece, una riduzione altamente significativa ($P<0.001$) dei

valori ottenuti nelle donne che hanno assunto l'integratore. In particolare, nel primo periodo la riduzione è stata del **50.8%** tra il basale e la settimana di somministrazione, mentre nel secondo del **54,0%**. Complessivamente, il trattamento con succo di mirtillo ha determinato una riduzione dell'indice di adesività batterica del **50.9%**, contro solo lo **0.29%** del placebo. Infine, non sono state evidenziate differenze significative tra i due gruppi di donne arruolate. Tra le volontarie sane si è osservata una riduzione del **49.5%**, mentre tra le pazienti con storia positiva di cistiti ricorrenti si è osservata una riduzione **52.4%** (*P* non significativa) [Graf. 6]. È importante puntualizzare che il trattamento è stato ben tollerato: non sono stati segnalati eventi avversi né durante né dopo la somministrazione dell'integratore.

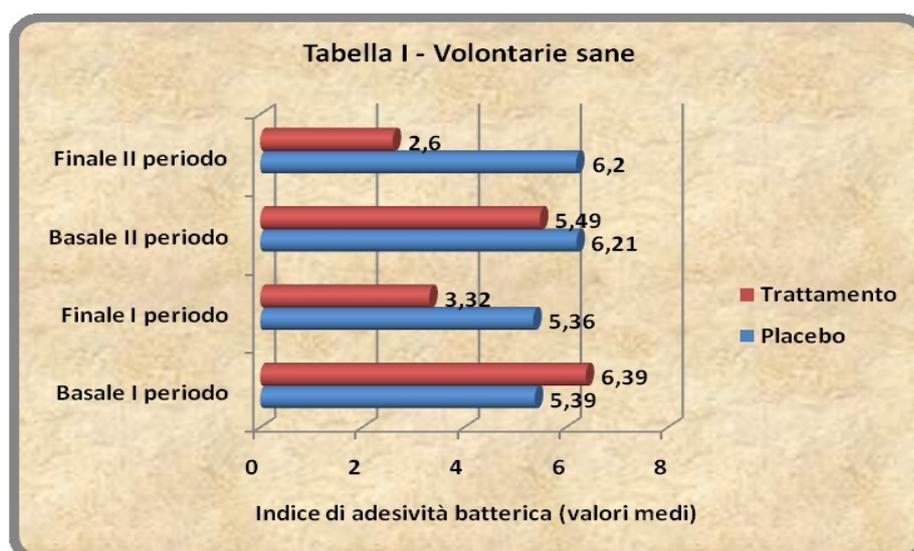


Grafico 4 Indice di adesività basale e finale nelle donne sane

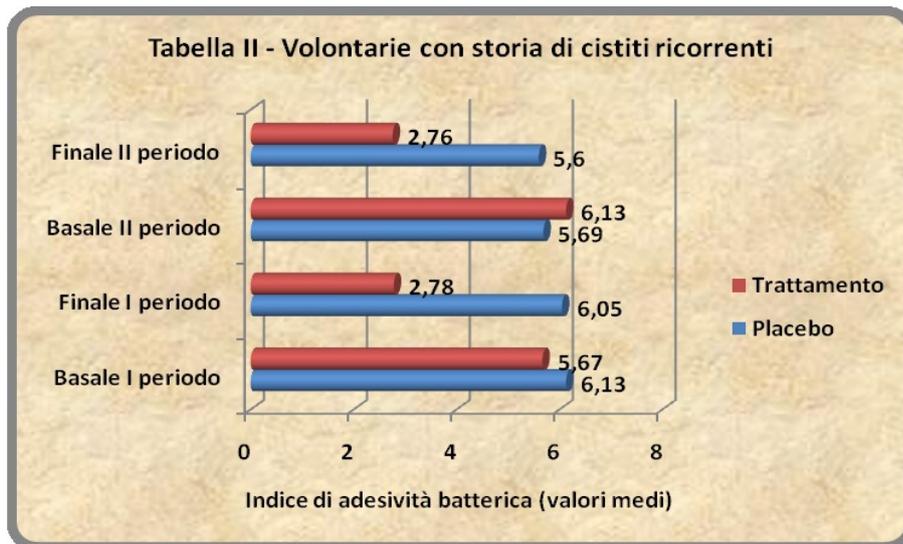


Grafico 5 Indice di adesività basale e finale nelle donne con storia di cistiti ricorrenti

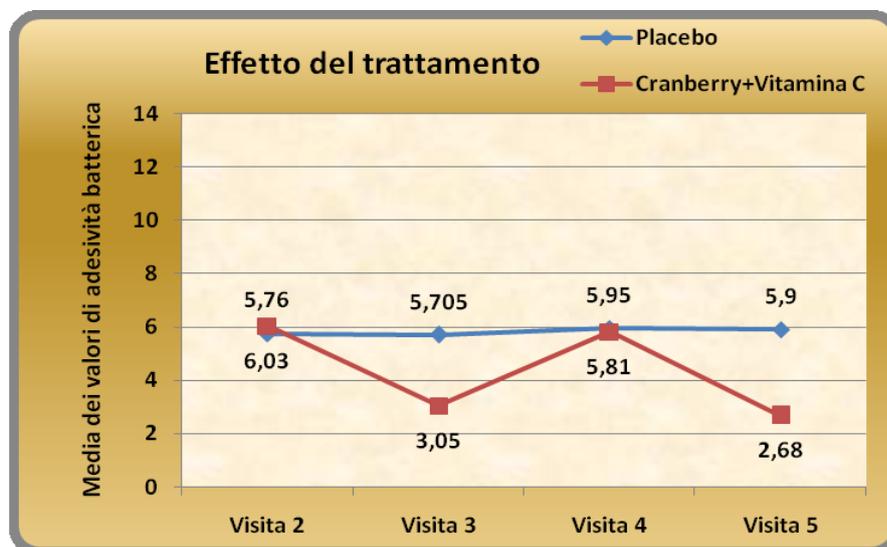


Grafico 6 Effetto del trattamento Cranberry+Vitamina C vs Placebo

7.4 Conclusioni

Questo studio ha consentito di evidenziare la presenza di una ricca letteratura riguardante i benefici derivanti dall'utilizzo del cranberry nelle donne sessualmente attive con storia di UTI ricorrenti. Tuttavia, è importante sottolineare come l'attuale utilizzo di tale droga sia essenzialmente a scopo profilattico. Infatti, gli effetti in caso di infezione attiva non sono stati ancora validati. Attualmente, si stanno effettuando studi approfonditi per comprendere meglio il meccanismo d'azione del succo di mirtillo. Per decenni, si è creduto che l'effetto benefico sul tratto urinario fosse dovuto all'acidità del succo, prodotta dalla trasformazione dell'acido benzoico in acido ippurico nelle urine. Questo abbassamento del pH renderebbe le urine un terreno di crescita non favorevole per i batteri patogeni. In seguito, è stato confermato che il principale microrganismo coinvolto nelle IVU è *Escherichia coli*, un batterio che presenta fimbrie di tipo 1 e fimbrie P con le quali aderisce alle cellule dell'urotelio. Dagli anni '80, l'attenzione dei ricercatori si è allontanata dai meccanismi precedentemente proposti, per iniziare a teorizzare la capacità del succo di cranberry di ridurre l'adesività dei batteri fimbriati alle cellule delle vie urinarie.^[286-288] La mancata adesione, pur non rappresentando un effetto

antibiotico in senso stretto, promuove l'eliminazione di *E. coli* riducendo, così, il rischio di sviluppo di un'infezione importante. Infine, un importante studio americano del 2005 ha chiarito nei dettagli i meccanismi d'azione del mirtillo rosso, vagliando le principali proposte teoriche al momento più accreditate:

- cranberry agisce direttamente sulle fimbrie, alterandone la lunghezza e la densità;
- in presenza di cranberry le proteine fimbriali risultano essere più compresse;
- componenti specifiche del succo si legano ai batteri con fimbrie P e ne inibiscono l'adesione;
- cranberry non riduce né rimuove il numero di fimbrie sulla superficie batterica;
- cranberry non ha la capacità di ridurre l'espressione genica delle fimbrie di *E. Coli*.^[289]

L'uso e spesso l'abuso di antibiotici sta sempre più acquistando rilevanza. Per questa ragione, la possibilità di utilizzare una sostanza ben tollerata che espliciti un effetto antimicrobico con meccanismi d'azione differenti dagli antibiotici classici, può essere considerata a tutti gli effetti una risorsa

importante da non sottovalutare. Questo lavoro ha consentito di evidenziare come l'assunzione del succo di mirtillo rosso, in concentrazioni adeguate, può essere d'aiuto nella protezione delle cellule epiteliali della vescica dall'adesione di ceppi UPEC. Infatti, la riduzione degli indici di adesività si è attestata intorno al 50%. Ad ogni modo, per supportare l'importanza dell'estratto di mirtillo nella prevenzione delle infezioni del tratto urinario, sarebbero stati necessari ulteriori studi atti a chiarire i meccanismi con cui il mirtillo fosse in grado di ridurre l'adesività dei batteri interferendo con l'espressione dei loro fattori di virulenza.

BIBLIOGRAFIA TESTO

- [1] Rhoades R., Pflanzner R. (1998), *“Fisiologia Umana”*, I edizione, Padova, *Piccin Nuova Libreria S.p.a.*, pp. 705-706.
- [2] Stamm W.E. (1998), *“Urinary tract infections and pyelonephritis”*, In *“Harrison’s: Principles of Internal Medicine”*, 14th Ed., McGraw-Hill, 1:817-822.
- [3] Faro S., Fenner D.E. (1998), *“Urinary tract infections”*, Clin. Obstet. Gynecol., 41: 744-754.
- [4] Jepsen O.B., Larsen S.O., Dankert J., Daschner F., Gronroos P., Meers P.D., Nystrom B., Rotter M., Sander J. (1982), *“Urinary-tract infection and bacteraemia in hospitalised medical patients – a European multicentre prevalence survey on nosocomial infection”*, *J. Hosp Infect*, 3(3):241-252.
- [5] Nicolle L.E. (2001), *“The chronic indwelling catheter and urinary infection in long-term-care facility residents”*, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 22(5):316-321.
- [6] Jepsen O.B. (1987), *“Urinary tract infections. An overview”*, *Chemioterapia*, 6(3):179-183.

- [7] Warren J.W. (2001), "*Catheter-associated urinary tract infections*", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17(4):299-303.
- [8] Klingenberg C., Småbrekke L., Dollner H., Simonsen G.S. (2009), "*Oral antibiotic treatment of urinary tract infections in children*", *Tidsskr Nor Laegeforen*, 129(13):1342-1344.
- [9] Williams G., Craig J.C. (2009), "*Prevention of recurrent urinary tract infection in children*", *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 22(1):72-76.
- [10] Wagenlehner F.M., Weidner W., Naber K.G. (2009), "*An update on uncomplicated urinary tract infections in women*", *Curr. Opin. Urol.*, 19(4):368-374.
- [11] Richard E., Reese M.D., R. Gordon Douglas, Jr., M.D. (1986), "*Manuale Pratico di Malattie Infettive*", Roma, Antonio Delfino Editore, pp. 375-376.
- [12] Zangara A. (1999), "*Terapia delle Malattie Infettive nell'adulto e nell'anziano*", Padova, Piccin Nuova Libreria S.p.a., pp. 341-343.
- [13] Foxman B. (2002), "*Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs*", *Am. J. Med.* 113 (Suppl. 1A), 5S-13S.
- [14] Mazzulli T. (2002), "*Resistance trends in urinary tract pathogens*

and impact on management”, *J. Urol.*, 168:1720-1722.

- [15] Haley R.W., Culver D.H., White J.W., Morgan W.M., Emori T.G. (1985), “*The nationwide nosocomial infection rate. A new need for vital statistics*”, *Am. J. Epidemiol.*, 121:159-167.
- [16] Lai K.K., Fontecchio S.A. (2002), “*Use of silver-hydrogel urinary catheters on the incidence of catheter-associated urinary tract infections in hospitalized patients*”, *Am. J. Infect. Control.*, 30(4):221-225.
- [17] Patton J.P., Nash D.B., Abrutyn E. (1991), “*Urinary tract infection: economic considerations*”, *Med. Clin. North Am.*, 75:495-513.
- [18] Ferri C., Marchetti F., Nickel J.C., Naber K.G. (2005), “*Prevalence and clinical management of complicated urinary tract infections in Italy: a prospective multicenter epidemiological study in urological outpatients*”, *J. Chemother.*, 17:601-606.
- [19] Crepaldi G., Baritussio A., (2003), “*Trattato di Medicina Interna*”, Padova, *Piccin Nuova Libreria S.p.a.*, 3:3601.
- [20] Naber K.G. (Chairman), Bishop M.C., Bjerklund-Johansen T.E., Botto H., Çek M., Grabe, M. Lobel B., Palou J., Tenke P. (2006), Guidelines on: “*The management of urinary and male genital tract*

infections”, *European Association of Urology*.

- [21] Kahlmeter G., ECO.SENS. (2003), “*An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project*”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 51(1):69-76.
- [22] Nicolle L.E. (2002), “*Resistant pathogens in urinary tract infections*”, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 50(7 Suppl):S230-S235.
- [23] Villers D., Espaze E., Coste-Burel M. *et al.* (1998), “*Nosocomial Acinetobacter baumannii infections: microbiological and clinical epidemiology*”, *Ann. Int. Med.*, 129:182-189.
- [24] Vila J. (1998), “*Mechanisms of antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii*”, *Rev. Med. Microbiol.*, 9:87-97.
- [25] Levin A.S., Barone A.A., Penco J., Santos M.V., Marinho I.S., Arruda E.A., Manrique E.I., Costa S.F. (1999), “*Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii*”, *Clin. Infect. Dis.*, 28:1008-1011.
- [26] Castilla R., Passeron S., Cantore M.L. (1998), “*N-acetyl-D-glucosamine induces germination in Candida albicans through a*

mechanism sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase”, *Cell Signal*, 10:713-719.

- [27] Mitchell A.P. (1998), “*Dimorphism and virulence in Candida albicans*”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1:687-692.
- [28] Ross I.K., De Bernardis F., Emerson G.W., Cassone A., Sullivan P.A. (1990), “*The secreted aspartate proteinase of Candida albicans: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant*”, *J. Gen. Microbiol.*, 136:687-694.
- [29] Sobel J.D., Muller G., Buckley H.R. (1984), “*Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis*”, *Infect. Immun.*, 44:576-580.
- [30] Ibrahim A.S., Mirbod F., Filler S.G., Yoshiko B., Cole G., Kitajima Y., Edwards J.E. Jr., Nosawa Y., Ghannoum M.A. (1995), “*Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of Candida albicans*”, *Infect. Immun.*, 63:1993-1998.
- [31] Lipsky B.A., Hook E.W. III, Smith A.A., Plorde J.J. (1980), “*Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature*”, *Rev. Infect. Dis.*, 2:746-760.

- [32] Drelichman V., Bond J.D. (1985), "*Bacteremias due to Citrobacter diversus and Citrobacter freundii: incidence, risk factors and clinical outcome*", *Arch. Intern. Med.*, 145:1808-1810.
- [33] Pepperell C., Kus J.V., Gardam M.A., Humar A., Burrows L.L. (2002), "*Low-virulence Citrobacter species encode resistance to multiple antimicrobials*", *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 46(11):3555-3560.
- [34] Devriese L.A., Pot B., Collins M.D. (1993), "*Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups*", *J. Appl. Bacteriol.*, 75:399-408.
- [35] Huycke M., Sahm D., Gilmore S. (1998), "*Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future*", *Emerg. Infect. Dis.*, 4:1218-1231.
- [36] Murray B.E. (1992), " *β -Lactamase-producing enterococci*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36:2355-2359.
- [37] Leclercq R., Courvalin P. (1997), "*Resistance to glycopeptides in enterococci*", *Clin. Infect. Dis.*, 24:545-556.
- [38] Coburn P.S., Gilmore M.S. (2003), "*The Enterococcus faecalis*

cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells”, *Cellular Microbiology*, 5(10):661-669.

- [39] Donelli G., Falzano L., Fabbri A., Fiorentini C., Mastrantonio P. (2000), “*Enteric toxins from bacteria colonizing human gut*”, *Microb. Ecol. Health. Dis.*, (Suppl 2):194-208.
- [40] Caprioli A., Falbo V., Ruggeri F.M., Baldassarri L., Bisicchia R., Ippolito G., Romoli E., Donelli G. (1987), “*Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of Escherichia coli causing extraintestinal infections*”, *J. Clin. Microbiol.*, 25:146-149.
- [41] Connell H., Poulsen L.K., Klemm P. (2000), “*Expression of type 1 and P fimbriae in situ and localisation of a uropathogenic Escherichia coli strain in the murine bladder and kidney*”, *Int. J. Med. Microbiol.*, 290:587-597.
- [42] Sakarya S., Ertem G.T., Oncu S., Kocak I., Erol N., Oncu S. (2003), “*Escherichia coli bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence*”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 39:45-50.
- [43] Domenico P., Salo R.J., Cross A.S., Cunha B.A. (1994), “*Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsono*

phagocytosis in Klebsiella pneumoniae”, *Infect. Immun.*, 62:4495-4499.

- [44] Mobley H.L., Warren J.W. (1987), “*Urease positive bacteriuria and obstruction of long term urine catheters*”, *J. Clin. Microbiol.*, 25:2216-2217.
- [45] Mobley H.L., Hausinger R.P. (1989), “*Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization*”, *Microbiol. Rev.*, 53:85-108.
- [46] Jones B.D., Mobley H.L.T. (1987), “*Genetic and biochemical diversity of ureases of Proteus, Providentia and Morganella species isolated from urinary tract infection*”, *Infect. Immun.*, 55:2198-2203.
- [47] Mobley H.L., Chippendale G.R. (1990), “*Haemagglutinin, urease and haemolysin production by Proteus mirabilis in clinical sources*”, *J. Infect. Dis.*, 161(3):525-530.
- [48] Welch R.A. (1987), “*Identification of two different haemolysin determinants in uropathogenic Proteus isolates*”, *Infect. Immun.*, 55:2183-2190.
- [49] Allison C., Coleman N., Jones P.L., Hughes C. (1992), “*Ability of Proteus mirabilis to invade human uroepithelial cells is coupled to*

motility and swarming differentiation”, *Infect. Immun.*, 60:4740-4746.

- [50] Peerbooms P.G.H., Verwieg A.M.J.J., Mac Laren D.M. (1984), “*Vero cell invasiveness of Proteus mirabilis*”, *Infect. Immun.*, 43:1068-1071.
- [51] Loomes L.M., Senior B.W., Kerr M.A. (1990), “*A proteolytic enzyme secreted by Proteus mirabilis degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2 and IgG isotypes*”, *Infect. Immun.*, 58:1979-1985.
- [52] Moayeri N., Collins C.M., O’Hanley P. (1991), “*Efficacy of a Proteus mirabilis outer membrane protein vaccine in preventing experimental pyelonephritis in a BALB/C mouse model*”, *Infect. Immun.*, 59:3778-3786.
- [53] O’Hara Mohr C., Brenner F.W., Miller J.M. (2000), “*Classification, identification and clinical significance of Proteus, Providencia and Morganella*”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 13:534-546.
- [54] Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S.L., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-

Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K.S., Wu Z., Paulsenk I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E.W., Lory S., Olson M.V. (2000), "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen", *Nature*, 406:959-964.

- [55] Hancock R.E. (1998), "Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermentative Gram-negative bacteria", *Clin. Infect. Dis.*, 27:S93-S99.
- [56] Hejazi A., Falkiner F.R. (1997), "*Serratia marcescens*", *J. Med. Microbiol.*, 46:903-1012.
- [57] Lowy F.D. (1998), "*Staphylococcus aureus* infections", *N. Engl. J. Med.*, 339:520-532.
- [58] Denton M., Kerr K.G. (1998), "Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*", *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:57-80.
- [59] Walsh T.R., MacGowan A.P., Bennett P.M. (1997), "Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*", *Antimicrob. Agents Chemother.*,

41:1460-1464.

- [60] Rossi A., Arcoraci V., Caputi A.P., Nicoletti G., Schito G.C. (2004), *“I risultati dello studio IceA”*, *SIMG*, 2:14-19.
- [61] Hyatt J.M., McKinnon P.S., Zimmer G.S., Schentag J.J. (1995), *“The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome: focus on antibacterial agents”*, *Clin. Pharmacokinet.*, 28:143-160.
- [62] Warren J.W., Abrutyn E., Hebel J.R., Johnson J.R., Schaeffer A.J., Stamm W.E. (1999), *“Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women”*, *Clin. Infect. Dis.*, 29:745-758.
- [63] Naber K.G., Bergman B., Bishop M.C., Bjerklund-Johansen T.E., Botto H., Lobel B, et al. (2001), *“EAU guidelines for the management of urinary and male genital tract infections”*, *Eur. Urol.*, 40:576-588.
- [64] Fihn S.D. (2003), *“Acute uncomplicated urinary tract infections in women”*, *N. Engl. J. Med.*, 349:259-266.
- [65] Gupta K., Hooton T.M., Stamm W.E. (2001), *“Increasing*

antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections”, *Ann. Int. Med.*, 135:41-50.

- [66] Spizek J., Novotná J., Rezanka T., Demain A.L. (2010), “*Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds*”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37(12):1241- 1248.
- [67] Péchère J.C. (1994), “*Antibiotic resistance is selected primarily in our patients*”, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15:472-477.
- [68] Levy S.B. (1998), “*The challenge of antibiotic resistance*”, *Sci. Am.*, 278:46-53.
- [69] House of Lords Select Committee on Science and Technology (1998), “*Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents*”, Session 1997-1998, 7th Report, *London: The Stationary Office*.
- [70] Cohen F.L., Tartasky D. (1997), “*Microbial resistance to drug therapy: a review*”, *Am. J. Infect. Control.*, 25:51-64.
- [71] Opinion of the Section for Protection of the Environment Public Health and Consumer Affairs on the “*Resistance to antibiotics as a threat to public health*”, ENVI/471.
- [72] Gold H.S., Moellering R.C. (1996), “*Antimicrobial-drug*

resistance”, *N. Engl. J. Med.*, 335:1445-1453.

- [73] Goossens H. (1998), “*Spread of vancomycin-resistant enterococci: differences between the United States and Europe*”, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 19:546-551.
- [74] WHO Geneva (1997), “*Weekly epidemiological record*”, 72:333-340.
- [75] Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., Poste G. (1997), “*To search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 497-503.
- [76] Livermore D.M. (2003), “*Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact*”, *Clin. Infect. Dis.*, 36(Suppl 1):S11-23.
- [77] Wood M.J., Moellering R.C. (2003), “*Microbial resistance: bacteria and more*”, *Clin. Infect. Dis.*, 36(Suppl 1):S2-3.
- [78] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2003), “*Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*”, Twelfth informational supplement: M100-S12, Vol. 22, NCCLS Wayne, PA.
- [79] Livermore D.M., Winstanley T.G., Shannon K.P. (2001), “*Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring*

resistance mechanisms from resistance phenotypes”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 48(Suppl. S1):87-102.

- [80] Davies J. (1994), “*Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes*”, *Science*, 264: 375-382.
- [81] Rice L.B. (1998), “*Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants*”, *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 42: 1871-1877.
- [82] Walsh C. (2003), “*Antibiotics: actions, origins, resistance*”, Washington, *American Society for Microbiology Press*, pp.89-156.
- [83] Debbia E.A. (2002), “*Appunti di microbiologia*”, *Ennepilibri ed.*, pp. 56-62.
- [84] Craig W.A. (1998), “*Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antimicrobial dosing of mice and men*”, *Clin. Infect. Dis.*, 26:1-12.
- [85] Nikaido H. (2003), “*Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67:593-656.
- [86] Spratt B.G. (1994), “*Resistance to antibiotic mediated by target alterations*”, *Science*, 264: 388-393.
- [87] Austin D.J. et al. (1999), “*The relationship between the volume of*

antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance”, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 96:1152-1156.

- [88] Chaix C. et al. (1999), “Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in an intensive care unit”, *JAMA*, 282:1745-1751.
- [89] La Placa (2008), “Principi di Microbiologia Medica”, XI edizione, Bologna, *Esculapio*, pp. 142-147.
- [90] Tempera G., Renzini R. (1993), “Microbiologia Generale e Applicata”, Bologna, *Esculapio*, pp. 204-205.
- [91] Fegiz, Marrano, Ruberti (1996), “Manuale di Chirurgia Generale”, Padova, *Piccin Nuova Libreria S.p.a.*, 2:2801-2804.
- [92] Puorger Chasper, Eidam Oliv, Capitani Guido, Erilov Denis, Grütter Markus G., Glockshuber Rudi (2008), “Infinite Kinetic Stability against Dissociation of Supramolecular Protein Complexes through Donor Strand Complementation”, *Structure, Elsevier*, 16(4):631-642.
- [93] Wold A.E., Mestecky J., Tomana M., Kobata A., Ohbayashi H., Endo T. et al. (1990), “Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin”,

Infect. Immun., 58:3073–3077.

- [94] Baorto D.M., Gao Z., Malaviya R., Dustin M.L., Van der Merwe A., Lublin D.M. *et al.* (1997), “*Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic*”, *Nature*, 389:636–639.
- [95] Leusch H.G., Drzeniek Z., Markos-Pusztai Z., Wagener C. (1991), “*Binding of Escherichia coli and Salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose*”, *Infect. Immun.*, 59:2051–2057.
- [96] Sauter S.L., Rutherford S.M., Wagener C., Shively J.E., Hefta S.A. (1991), “*Binding of nonspecific cross-reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to Escherichia coli expressing type 1 fimbriae*”, *Infect. Immun.*, 59:2485–2493.
- [97] Pak J., Pu Y., Zhang Z.T., Hasty D.L., Wu X.R. (2001), “*Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated Escherichia coli and prevents E. coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors*”, *J. Biol. Chem.*, 276:9924–9930.
- [98] Gbarah A., Gahmberg C.G., Ofek I., Jacobi U., Sharon N. (1991),

“Identification of the leukocyte adhesion molecules CD11 and CD18 as receptors for type 1-fimbriated (mannose-specific) Escherichia coli”, *Infect. Immun.*, 59:4524–4530.

- [99] Eto D.S., Jones T.A., Sundsbak J.L., Mulvey M.A. (2007), *“Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli”*, *PLoS Pathog.*, 3(7):e100.
- [100] Zhou G., Mo W.J., Sebbel P., Min G., Neubert T.A., Glockshuber R. *et al.* (2001), *“Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding”*, *J. Cell. Sci.*, 114:4095–4103.
- [101] Pouttu R., Puustinen T., Virkola R., Hacker J., Klemm P., Korhonen T.K. (1999), *“Aminoacid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesin is critical for the adhesiveness of meningitis-associated Escherichia coli to collagens”*, *Mol. Microbiol.*, 31:1747–1757.
- [102] Kukkonen M., Raunio T., Virkola R., Lahteenmaki K., Makela P.H., Klemm P. *et al.* (1993), *“Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of Salmonella enterica and Escherichia coli to laminin”*, *Mol. Microbiol.*, 7:229–237.

- [103] Sokurenko E.V., Courtney H.S., Abraham S.N., Klemm P., Hasty D.L. (1992), “*Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of Escherichia coli*”, *Infect. Immun.*, 60:4709–4719.
- [104] Martinez J.J., Mulvey M.A., Schilling J.D., Pinkner J.S., Hultgren S.J. (2000), “*Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells.*”, *Embo J.*, 19:2803–2812.
- [105] Arnaout M.A., Mahalingam B., Xiong J.P. (2005), “*Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling*”, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 21:381–410.
- [106] Martinez J.J., Hultgren S.J. (2002), “*Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli*”, *Cell. Microbiol.*, 4:19–28.
- [107] Song J., Bishop B.L., Li G., Duncan M.J., Abraham S.N. (2007), “*TLR4-initiated and cAMP-mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder*”, *Cell. Host. Microbe*, 1:287–298.
- [108] Shoelson S.E., Sivaraja M., Williams K.P., Hu P., Schlessinger J., Weiss M.A. (1993), “*Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation*”, *Embo J.*, 12:795–802.

- [109] Yin H.L., Janmey P.A. (2003), "*Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton*", *Annu. Rev. Physiol.*, 65:761–789.
- [110] Hartwig J.H., Bokoch G.M., Carpenter C.L., Janmey P.A., Taylor L.A., Toker A. *et al.* (1995), "*Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets*", *Cell.*, 82:643–653.
- [111] Wright K.J., Seed P.C., Hultgren S.J. (2007), "*Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili*", *Cell. Microbiol.*, 9:2230–2241.
- [112] Eto D.S., Sundsbak J.L., Mulvey M.A. (2006), "*Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic Escherichia coli*", *Cell. Microbiol.*, 8:704–717.
- [113] Anderson G.G., Palermo J.J., Schilling J.D., Roth R., Heuser J., Hultgren S.J. (2003), "*Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections*", *Science*, 301:105–107.
- [114] Ulett G.C., Valle J., Beloin C., Sherlock O., Ghigo J.M., Schembri M.A. (2007), "*Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic Escherichia coli reveals a role in long-term persistence in the*

urinary tract”, *Infect. Immun.*, 75:3233–3244.

- [115] Schlager T.A., Whittam T.S., Hendley J.O., Bhang J.L., Wobbe C.L., Stapleton A. (2003), “*Variation in frequency of the virulence-factor gene in Escherichia coli clones colonizing the stools and urinary tracts of healthy prepubertal girls*”, *J. Infect. Dis.*, 188:1059–1064.
- [116] Thankavel K., Madison B., Ikeda T., Malaviya R., Shah A.H., Arumugam P.M. *et al.* (1997), “*Localization of a domain in the FimH adhesin of Escherichia coli type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection*”, *J. Clin. Invest.*, 100:1123–1136.
- [117] Connell H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S., Svanborg C. (1996), “*Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9827–9832.
- [118] Langermann S., Palaszynski S., Barnhart M., Auguste G., Pinkner J.S., Burlein J. *et al.* (1997), “*Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination*”,

Science, 276:607–611.

- [119] Brinton C.C. (1959), “*Non-flagellar appendages of bacteria*”, *Nature*, 183:782–786.
- [120] Buchanan K., Falkow S., Hull R.A., Hull S.I. (1985), “*Frequency among Enterobacteriaceae of the DNA sequences encoding type 1 pili*”, *J. Bacteriol.*, 162:799–803.
- [121] Xiang-Qi Mu, E. Bullitt (2006), “*PNAS*”, 26:9861-9866.
- [122] Roberts, J.A., Marklund, B.I., Ilver D., Haslam D., Kaack M.B., Baskin G. *et al.* (1994), “*The Gal a (1–4) Gal-specific tip adhesin of Escherichia coli P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:11889–11893.
- [123] Stromberg N., Marklund B.I., Lund B., Ilver D., Hamers A., Gaastra W. *et al.* (1990), “*Host-specificity of uropathogenic Escherichia coli depends on differences in binding specificity to Gala (1–4) Gal-containing isoreceptors*”, *EMBO J.*, 9:2001–2010.
- [124] Stromberg N., Nyholm P.G., Pascher I., Normark S. (1991), “*Saccharide orientation at the cell surface affects glycolipid*

receptor function”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9340–9344.

- [125] Feria C., Machado J., Duarte Correia J., Goncalves J., Gaastra W. (2001), “*Distribution of papG alleles among uropathogenic Escherichia coli isolated from different species*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 202:205–208.
- [126] Lindberg F., Tennent J. M., Hultgren S. J., Lund B., Normark S. (1989), “*PapD, a periplasmic transport protein in P-pilus biogenesis*”, *J. Bacteriol.*, 171(11):6052-6058.
- [127] Klemm P. (1992), “*FimC, a chaperone-like periplasmic protein of Escherichia coli involved in biogenesis of type I fimbriae*”, *Res. Microbiol.*, 143:831–838.
- [128] Kuehn M.J., Ogg D.J., Kihlberg J., Slonim L.N., Flemmer K., Bergfors T., Hultgren S.J. (1993), “*Structural basis of pilus subunit recognition by the PapD chaperone*”, *Science*, 262:1234-1241.
- [129] Hung D.L., Knight S.D., Hultgren S.J. (1999), “*Probing conserved surfaces on PapD*”, *Mol. Microbiol.*, 31(3):773-783.
- [130] Thanassi D.G., Stathopoulos C., Dodson K., Geiger D., Hultgren S.J. (2002), “*Bacterial outer membrane ushers contain distinct targeting and assembly domains for pilus biogenesis*”, *J. Bacteriol.*,

184:6260-6269.

- [131] Nishiyama M., Vetsch M., Puorger C., Jelesarov I., Glockshuber R. (2003), “*Identification and characterization of the chaperone-subunit complex-binding domain from the type 1 pilus assembly platform FimD*”, *J. Mol. Biol.*, 330:513-525.
- [132] Ng T. W., Akman L., Osisami M., Thanassi D. G. (2004), “*The usher N terminus is the initial targeting site for chaperone-subunit complexes and participates in subsequent pilus biogenesis events*”, *J. Bacteriol.*, 186(16):5321-5331.
- [133] Nishiyama M., Horst R., Eidam O., Herrmann T., Ignatov O., Vetsch M., Bettendorff P., Jelesarov I., Grutter M. G., Wuthrich K., Glockshuber R., Capitani G. (2005), “*Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD*”, *EMBO J.*, 24:2075-2086.
- [134] So S.S.K., Thanassi D.G. (2006), “*Analysis of the requirements for pilus biogenesis at the outer membrane usher and the function of the usher C-terminus*”, *Mol. Microbiol.*, 60(2):364-375.

- [135] Schmoll T., Hoschutzky H., Morschhauser J., Lottspeich F., Jann K., Hacker J. (1989), “*Analysis of genes coding for the sialic acid-binding adhesin and two other minor fimbrial subunits of the S-fimbrial adhesin determinant of Escherichia coli*”, *Mol. Microbiol.*, 3:1735–1744.
- [136] Korhonen T.K., Parkkinen J., Hacker J., Finne J., Pere A., Rhen M., Holthofer H. (1986), “*Binding of Escherichia coli S fimbriae to human kidney epithelium*”, *Infect. Immun.*, 54:322–327.
- [137] Moch T., Hoschutzky H., Hacker J., Kroncke K.D., Jann K. (1987), “*Isolation and characterization of the a-sialyl-b-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated Escherichia coli*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3462–3466.
- [138] Morschhauser J., Hoschutzky H., Jann K., Hacker J. (1990), “*Functional analysis of the sialic acid-binding adhesin SfaS of pathogenic Escherichia coli by site-specific mutagenesis*”, *Infect. Immun.*, 58:2133–2138.
- [139] Hanisch F.G., Hacker J., Schrotten H. (1993), “*Specificity of S fimbriae on recombinant Escherichia coli: preferential binding to gangliosides expressing NeuGc alpha (2–3) Gal and NeuAc alpha*

(2–8) NeuAc”, *Infect. Immun.*, 61:2108–2115.

- [140] Parkkinen J., Hacker J., Korhonen T.K. (1991), “*Enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by Escherichia coli S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis*”, *Thromb. Haemostasis*, 65:483–486.
- [141] Prasadarao N.V., Wass C.A., Hacker J., Jann K., Kim K.S. (1993), “*Adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to brain glycolipids mediated by sfaA gene encoded protein of S-fimbriae*”, *J. Biol. Chem.*, 268:10356–10363.
- [142] Morschhauser J., Vetter V., Korhonen T., Uhlin B.E., Hacker J. (1993), “*Regulation and binding properties of S fimbriae cloned from E. coli strains causing urinary tract infection and meningitis*”, *Zentralbl. Bakteriol.*, 278:165–176.
- [143] Korhonen T.K., Valtonen M.V., Parkkinen J., Vaisanen-Rhen V., Finne J., Orskov F., *et al.* (1985), “*Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of Escherichia coli strains associated with neonatal sepsis and meningitis*”, *Infect. Immun.*, 48:486–491.
- [144] Marre R., Hacker J., Henkel W., Goebel W. (1986), “*Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic*

Escherichia coli strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model”, *Infect. Immun.*, 54:761–767.

- [145] Parkkinen J., Korhonen T.K., Pere A., Hacker J., Soinila S. (1988), “Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis”, *J. Clin. Invest.*, 81:860–865.
- [146] Hacker J., Kestler H., Hoschutzky H., Jann K., Lottspeich F., Korhonen T.K. (1993), “Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18: K1 meningitis isolate”, *Infect. Immun.*, 61:544–550.
- [147] Malagolini N., Cavallone D., Wu X.R., Serafini-Cessi F. (2000), “Terminal glycosylation of bovine uroplakin III, one of the major integral-membrane glycoproteins of mammalian bladder”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1475:231–237.
- [148] Ott M., Hoschutzky H., Jann K., Van Die I., Hacker, J. (1988), “Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and FIC fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects structure function”, *J. Bacteriol.*, 170:3983–3990.
- [149] Khan A.S., Kniep B., Oelschlaeger T.A., Van Die I., Korhonen T.,

- Hacker J. (2000), "Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*", *Infect. Immun.*, 68:3541–3547.
- [150] Nowicki B., Selvarangan R., Nowicki S. (2001), "Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness", *J. Infect. Dis.*, 183(Suppl. 1):S24–S27.
- [151] Goluszko P., Moseley S.L., Truong L.D., Kaul A., Williford J.R., Selvarangan R., *et al.* (1997b), "Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75: K5: H-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubulointerstitial nephritis", *J. Clin. Invest.*, 99:1662–1672.
- [152] Goluszko P., Niesel D., Nowicki B., Selvarangan R., Nowicki S., Hart A. *et al.* (2001), "Dr operon-associated invasiveness of *Escherichia coli* from pregnant patients with pyelonephritis", *Infect. Immun.*, 69:4678–4680.
- [153] Guignot J., Peiffer I., Bernet-Camard M.F., Lublin D.M., Carnoy C., Moseley S.L., Servin A.L. (2000), "Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated glycosylphosphatidylinositol-

anchored proteins by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of Escherichia coli that infect the human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells”, *Infect. Immun.*, 68:3554–3563.

- [154] Stenutz R. et al. (2006), “*The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens*”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 30:382–403.
- [155] Bidet P. et al. (2007), “*Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes Escherichia coli subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis*”, *J. Infect. Dis.*, 196:297–303.
- [156] Lloyd A.L. et al. (2007), “*Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, 189:3532–3546.
- [157] Allen P.M. et al. (1987), “*Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of Escherichia coli coli K1*”, *Infect. Immun.*, 55:2662–2668.
- [158] Kim K.J. et al. (2003), “*The K1 capsule modulates trafficking of E. coli-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells*”, *Cell. Microbiol.*, 5:245–252.

- [159] Pluschke G. et al. (1983), “*Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 Escherichia coli to complement-mediated killing. Infect., Immun.*”, 42:907–913.
- [160] Scholl D. et al. (2005), “*Escherichia coli K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:4872–4874.
- [161] Van Dijk W.C. et al. (1979), “*Role of Escherichia coli K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization*”, *Infect. Immun.*, 25:603–609.
- [162] Ewers C. et al. (2007), “*Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing Escherichia coli: how closely related are they?*”, *Int. J. Med. Microbiol.*, 297:163–176.
- [163] Henderson I.R. et al. (2004), “*Type V protein secretion pathway: the autotransporter story*”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68:692–744.
- [164] Johnson J.R. (1991), “*Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection*”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:80–128.
- [165] Marrs C.F., et al. (2005), “*Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes?*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 252:183–190.

- [166] Bhakdi S. et al. (1988), “*The hemolysin of Escherichia coli*”, *Eur. J. Epidemiol.*, 4:135–143.
- [167] Boehm D.F. et al. (1990a), “*Calcium is required for binding of Escherichia coli hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes*”, *Infect. Immun.*, 58:1951–1958.
- [168] Boehm D.F. et al. (1990b), “*Domains of Escherichia coli hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes*”, *Infect. Immun.*, 58:1959–1964.
- [169] Ostolaza H., Goni F.M. (1995), “*Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity*”, *FEBS Lett.*, 371:303–306.
- [170] Hamon M.A. et al. (2007), “*Histone modifications induced by a family of bacterial toxins*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:13467–13472.
- [171] Ratner A.J. et al. (2006), “*Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins*”, *J. Biol. Chem.*, 281:12994–12998.
- [172] Wiles T.J. et al. (2008), “*Inactivation of host AKT/PKB signaling by bacterial pore-forming toxins*”, *Mol. Biol. Cell.*, 19:1427–1438.

- [173] Cavalieri S.J., Snyder I.S. (1982), “*Effect of Escherichia coli alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro*”, *Infect. Immun.*, 37:966–974.
- [174] Koschinski A. et al. (2006), “*Why Escherichia coli alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells—the pore is on its own*”, *FASEB J.*, 20:973–975.
- [175] Mansson L.E. et al. (2007), “*Role of the lipopolysaccharide–CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic Escherichia coli*”, *Infect. Immun.*, 75:997–1004.
- [176] TranVan Nhieu G. et al. (2004), “*Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens*”, *Biol. Cell.*, 96:93–101.
- [177] Uhlen P. et al. (2000), “*Alpha-haemolysin of uropathogenic E. coli induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells*”, *Nature*, 405:694–697.
- [178] Restieri C. et al. (2007), “*Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:1553–1562.
- [179] Parreira V.R., Gyles C.L. (2003), “*A novel pathogenicity island*

integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic Escherichia coli encodes a vacuolating autotransporter toxin", *Infect. Immun.*, 71:5087–5096.

- [180] Guyer D.M. et al. (2002), "*Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic Escherichia coli, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells*", *Infect. Immun.*, 70:4539–4546.
- [181] Maroncle N.M. et al. (2006), "*Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic Escherichia coli*", *Infect. Immun.*, 74:6124–6134.
- [182] Kuehn M.J., Kesty N.C. (2005), "*Bacterial outer membrane vesicles and the host–pathogen interaction*", *Genes Dev.*, 19:2645–2655.
- [183] Mashburn-Warren L.M., Whiteley M. (2006), "*Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes*", *Mol. Microbiol.*, 61:839–846.
- [184] Balsalobre C. et al. (2006), "*Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from Escherichia coli*", *Mol. Microbiol.*, 59:99–112.

- [185] Davis J.M. et al. (2006), “*Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic Escherichia coli attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis*”, *Infect. Immun.*, 74:4401–4408.
- [186] Kouokam J.C. et al. (2006), “*Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic Escherichia coli*”, *Infect. Immun.*, 74:2022–2030.
- [187] Lemonnier M. et al. (2007), “*Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology*”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 31:515–534.
- [188] Etienne-Manneville S., Hall A. (2002), “*Rho GTPases in cell biology*”, *Nature*, 420:629–635.
- [189] Bower, J.M. et al. (2005), “*Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract*”, *Traffic*, 6:18–31.
- [190] Rippere-Lampe K.E. et al. (2001), “*Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic Escherichia coli*”, *Infect. Immun.*, 69:3954–3964.
- [191] Mills M. et al. (2000), “*Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic Escherichia coli kills cultured human uroepithelial*

5637 cells by an apoptotic mechanism”, *Infect. Immun.*, 68:5869–5880.

[192] Doye A. et al. (2002), “*CNF1 exploits the ubiquitin–proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion*”, *Cell.*, 111:553–564.

[193] Davis J.M. et al. (2005), “*Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic Escherichia coli modulates polymorphonuclear leukocyte function*”, *Infect. Immun.*, 73:5301–5310.

[194] Roos V. et al. (2006c), “*The asymptomatic bacteriuria Escherichia coli strain 83972 outcompetes uropathogenic E. coli strains in human urine*”, *Infect. Immun.*, 74:615–624.

[195] Hull R. et al. (2000), “*Urinary tract infection prophylaxis using Escherichia coli 83972 in spinal cord injured patients*”, *J. Urol.*, 163:872–877.

[196] Hull R.A. et al. (1999), “*Virulence properties of Escherichia coli 83972, a prototype strain associated with asymptomatic bacteriuria*”, *Infect. Immun.*, 67:429–432.

[197] Klemm P. et al. (2006), “*Molecular characterization of the*

Escherichia coli asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen”, *Infect. Immun.*, 74:781–785.

- [198] Roos V. et al. (2006b), “Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 carries mutations in the *foc* locus and is unable to express *F1C* fimbriae”, *Microbiology*, 152:1799–1806.
- [199] Klemm P. et al. (2007), “Mellowing out: adaptation to commensalism by *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972”, *Infect. Immun.*, 75:3688–3695.
- [200] Nagy G. et al. (2002), “Loss of regulatory protein *RfaH* attenuates virulence of uropathogenic *Escherichia coli*”, *Infect. Immun.*, 70:4406–4413.
- [201] Roos V., Klemm P. (2006), “Global gene expression profiling of the asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 in the human urinary tract”, *Infect. Immun.*, 74:3565–3575.
- [202] Hancock V. et al. (2007), “Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 267:30–37.
- [203] Roos V. et al. (2006a), “Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition”, *FEMS Microbiol. Lett.*,

262:22–30.

- [204] Zdziarski J. et al. (2008), “*Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation?*”, *Infect. Immun.*, 76(2):695-703.
- [205] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999), “*Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections*”, *Science*, 284:1318–1322.
- [206] Davey M.E., O’Toole G.A. (2000), “*Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:847–867.
- [207] Donlan R.M. (2002), “*Biofilms: Microbial life on surfaces*”, *Emerg. Inf. Dis.*, 8:881–890.
- [208] Dunne M.W. Jr. (2002), “*Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately?*”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15:155–166.
- [209] Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002), “*Biofilms as complex differentiated communities*”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56:187–209.
- [210] Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. (1998), “*The involvement of cell-to-cell signals*

in the development of a bacterial biofilm”, *Science*, 280:295–298.

- [211] Yarwood J.M., Bartels D.J., Volper E.M., Greenberg E.P. (2004), “Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms”, *J. Bacteriol.*, 186:1838–1850.
- [212] Ahmer B.M. (2004), “Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*”, *Mol. Microbiol.*, 52:933–945.
- [213] Henikoff S., Wallace J.C., Brown J.P. (1990), “Finding protein similarities with nucleotide sequence databases”, *Methods Enzymol.*, 183:111–132.
- [214] DeLisa M.P., Wu C.F., Wang L., Valdes J.J., Bentley W.E. (2001), “DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer-2 stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, 183:5239–5247.
- [215] Sperandio V., Torres A.G., Giron J.A., Kaper J.B. (2001), “Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7”, *J. Bacteriol.*, 183:5187–5197.
- [216] Hausner M., Wuertz S. (1999), “High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis”,

Appl. Environ. Microbiol., 65(8):3710-3713

- [217] Watnick P., Kolter R. (2000), “*Biofilm, city of microbes*”, *J. Bacteriol.*, 182(10):2675-2679
- [218] Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J.A., Molin S., Prensier G., Arbeille B., Ghigo J.M. (2004), “*Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression*”, *Mol. Microbiol.*, 51:659-674.
- [219] Ren D., Bedzyk L.A., Thomas S.M., Ye R.W., Wood T.K. (2004), “*Gene expression in Escherichia coli biofilms*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64:515–524.
- [220] Schembri M.A., Kjaergaard K., Klemm P. (2003), “*Global gene expression in Escherichia coli biofilms*”, *Mol. Microbiol.*, 48:253–267.
- [221] Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. (1998), “*The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*”, *Science*, 280:295-298.
- [222] Donlan R.M., Costerton J.W. (2002), “*Biofilms: survival*

mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2):167-193

- [223] Costerton J. W., P. S. Stewart, E. P. Greenberg (1999), “*Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*”, *Science*, 284:1318-1322.
- [224] Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley H.L.T., Shirtliff M.E. (2008), “*Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to Escherichia coli and Proteus mirabilis*”, *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1):26-59.
- [225] Foxman B. (2002), “*Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs*”, *Am. J. Med.*, 113(Suppl. 1A):5S-13S.
- [226] Leone M., Garnier F., Avidan M., Martin C. (2004), “*Catheter-associated urinary tract infections in intensive care units*”, *Microbes Infect.*, 6:1026-1032.
- [227] Ronald A. (2002), “*The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens*”, *Am. J. Med.*, 113(Suppl. 1A):14S-19S.
- [228] Anderson G.G., Palermo J.J., Schilling J.D., Roth R., Heuser J.,

Hultgren S. J. (2003), "*Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections*", *Science*, 301:105-107.

[229] Justice S.S., Hung C., Theriot J.A., Fletcher D.A., Anderson G.G.,

Footer M.J., Hultgren S.J. (2004), "*Differentiation and developmental pathways of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:1333-1338.

[230] Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R. (2001), "*Biofilm formation as a developmental process*", *Methods Enzymol.*, 336:19-26.

[231] Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R. (2000), "*Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture*", *J. Bacteriol.*, 182:3593-3596.

[232] Davey M.E., A.G. O'Toole (2000), "*Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:847-867.

[233] Wang X., J.F. Preston III, T. Romeo (2004), "*The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation*", *J. Bacteriol.*, 186:2724-

2734.

- [234] Zogaj X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, U. Römling (2001), “The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix”, *Mol. Microbiol.*, 39:1452-1463.
- [235] Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J.A., Molin S., Prensier G., Arbeille B., Ghigo J.M. (2004), “Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression”, *Mol. Microbiol.*, 51:659-674.
- [236] Dorel C., Vidal O., Prigent-Combaret C., Vallet I., Lejeune P. (1999), “Involvement of the *Cpx* signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 178:169-175.
- [237] Jubelin G., Vianney A., Beloin C., Ghigo J.M., Lazzaroni J.C., Lejeune P., Dorel C. (2005), “*CpxR/OmpR* interplay regulates *curli* gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, 187:2038-2049.

- [238] Otto K., T.J. Silhavy (2002), “*Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:2287-2292.
- [239] Prigent-Combaret C., Brombacher E., Vidal O., Ambert A., Lejeune P., Landini P., Dorel C. (2001), “*Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in Escherichia coli via regulation of the csgD gene*”, *J. Bacteriol.*, 183:7213-7223.
- [240] Römling U., Sierralta W.D., Eriksson K., Normark S. (1998), “*Multicellular and aggregative behaviour of Salmonella typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter*”, *Mol. Microbiol.*, 28:249-264.
- [241] Jackson D.W., Simecka J.W., Romeo T. (2002), “*Catabolite repression of Escherichia coli biofilm formation*”, *J. Bacteriol.*, 184:3406-3410.
- [242] Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E., Romeo T. (2002), “*Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, 184:290-301.

- [243] Adams J.L., McLean R.J. (1999), “*Impact of rpoS deletion on Escherichia coli biofilms*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4285-4287.
- [244] Corona-Izquierdo F.P., Membrillo-Hernandez J. (2002), “*A mutation in rpoS enhances biofilm formation in Escherichia coli during exponential phase of growth*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 211:105-110.
- [245] Brombacher E., Dorel C., Zehnder A. J., Landini P. (2003), “*The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in Escherichia coli*”, *Microbiology*, 149:2847-2857.
- [246] Ferrieres L., Clarke D. J. (2003), “*The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in Escherichia coli K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface*”, *Mol. Microbiol.*, 50:1665-1682.
- [247] Landini P., Zehnder A.J. (2002), “*The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown Escherichia coli by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production*”, *J. Bacteriol.*, 184:1522-

1529.

- [248] Haagmans W., Van der Woude M. (2000), “*Phase variation of Ag43 in Escherichia coli: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription*”, *Mol. Microbiol.*, 35:877-887.
- [249] Van der Woude M.W., Bäumlner A.J. (2004), “*Phase and antigenic variation in bacteria*”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 17:581-611.
- [250] Waldron D.E., Owen P., Dorman C.J. (2002), “*Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in Escherichia coli*”, *Mol. Microbiol.*, 44:509-520.
- [251] Wallecha A., Correnti J., Munster V., Van der Woude M. (2003), “*Phase variation of Ag43 is independent of the oxidation state of OxyR*”, *J. Bacteriol.*, 185:2203-2209.
- [252] Yarnell E. (2002), “*Botanical medicines for the urinary tract*”, *World J. Urol.*, 20(5):285-293.
- [253] Howell A.B. (2002), “*Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health*”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42(3 Suppl) 273-278.

- [254] Howell A.B., Vorsa D., Marderosian A.D., Foo L.Y. (1998), “*Inhibition of the adherence of P-fimbriated Escherichia coli to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanadin extract from cranberries*”, *The New England Journal of Medicine*, 339:1085-1086.
- [255] Foo L.Y., Lu Y., Howell A.B., Vorsa N. (2000), “*The structure of cranberry proanthocyanidines which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated E. coli in vitro*”, *Phytochemistry*, 54:173-181.
- [256] Gu L Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G. et al. (1981), “*Screening of foods containing proanthocyanidin and their structural characterization using LC-MS/MS and thilytic degradation*”, *J. Agric. Food Chem.*, 51:7513-7521.
- [257] Foo L.Y., Lu Y., Howell A.B., Vorsa N. (2000), “*A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated E. coli*”, *Journal of Natural Production*, 63(9):1225-1228.
- [258] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)
Saisine N. 2003-SA-0352 et saisine liée N. 2006-SA-0056-6, 2004.

- [259] Howell A.B., Foxman B. (2002), "*Cranberry juice and adhesion of antibiotic resistant uropathogens*", *JAMA*, 287:3082-3083.
- [260] Pérez-López F.R., Haya J., Chedraui P. (2009), "*Vaccinium macrocarpon: an interesting option for women with recurrent urinary tract infections and other health benefits*", *Obstet. Gynaecol. Res.*, 35(4):630-639.
- [261] Pham D.Q., Pham A.Q. (2007), "*Interaction potential between cranberry juice and warfarin*", *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, 64(5):490-494.
- [262] Guay D.R. (2009), "*Cranberry and urinary tract infections*", *Drugs*, 69(7):775-807.
- [263] Raz R., Chazan B., Dan M. (2004), "*Cranberry juice and urinary tract infection*", *Harefuah*, 143(12):891-894, 909.
- [264] Stapleton A. (2003), "*Novel approaches to prevention of urinary tract infections*", *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 17(2):457-471.
- [265] Stothers L. (2002), "*A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women*", *Can. J. Urol.*, 9(3):1558-1562.

- [266] Jepson R.G., Craig J.C. (2008), “*Cranberries for preventing urinary tract infections*”, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 1:CD001321.
- [267] Raz R., Chazan B., Dan M. (2004), “*Cranberry juice and urinary tract infection*”, *Clin. Infect. Dis.*, 38:1413-1419.
- [268] Bors W., Foo LY., Hertkorn N., Michel C., Stettmaier K. (2001), “*Chemical studies of proanthocyanidins and hydrolysable tannins*”, *Antioxid. Redox Signal.*, 3:995-1008.
- [269] Pinzón-Arango P.A., Liu Y., Camesano T.A. (2009), “*Role of cranberry on bacterial adhesion forces and implications for Escherichia coli-uroepithelial cell attachment*”, *J. Med. Food*, 12:259-270.
- [270] Ohnishi R. (2006), “*Urinary excretion of anthocyanins in humans after cranberry juice ingestion*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70:1681-1687.
- [271] Jass J., Reid G. (2009), “*Effect of cranberry drink on bacterial adhesion in vitro and vaginal microbiota in healthy females*”, *Can. J. Urol.*, 16:4901-4907.
- [272] Schiffman R., Wieden M., Brooker J., Chery M., Delduca M., Nordark K. et al. (1984), “*Bacteriuria screening by direct*

bioluminescence assay of ATP”, *J. Clin. Microbiol.*, 20:644-648.

- [273] Wu T., Williams E., Koo S., McLowry J. (1985), “*Evaluation of three bacteriuria screenin methods in a clinical research hospital*”, *J. Clin. Microbiol.*, 21:796-799.
- [274] Crepaldi G., Baritussio A. (2003), “*Trattato di Medicina Interna*”, Padova, Piccin Nuova Libreria S.p.a., 3:3607.
- [275] Barry, Smith, Turck (1975), “*Cumitech 2, Laboratory diagnosis of urinary tract infections*”, Coord. ed., Gavan. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- [276] Bridson E. Y. (2006), “*The Oxoid Manual*”, 9th Edition, Basingstoke, Oxoid Ltd.
- [277] Jabra-Rizk M. A., Troy M. Brenner, Mark Romagnoli, A.A.M.A. Baqui, William G. Merz, William A. Falkler, Jr., Timothy F. Meiller (2001), “*Evaluation of a Reformulated CHROMagar Candida*”, *J. Clin. Microbiol.*, 39(5):2015–2016.
- [278] Odds, F.C., and R. Bernaerts (1994), “*CHROMagar Candida Medium, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species*”, *J. Clin. Microbiol.*, 32:1923-1929.

- [279] Rugarli C. (2010), “*Medicina Interna Sistemica*”, VI edizione, Elsevier, pp. 847-850.
- [280] “*Riv. Med. Lab. – JLM*” (2002), SIRSE SRL ed., vol. 3, n°1.
- [281] Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2008), “*Elementi di Microbiologia*”, Firenze, Pearson Paravia Bruno Mondadori S.p.A., p. 542.
- [282] Bistoni F., Nicoletti G., Nicolosi V.M. (2008), “*Microbiologia e Microbiologia Clinica*”, Milano, Elsevier Masson, pp. 230-231.
- [283] CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute): “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement*”, M100-S18 Vol. 28 N° 1, January 2008.
- [284] Di Martino P., Agniel R., David K. et al. (2006), “*Reduction of Escherichia coli adherence to uroepithelial bladder cells after consumptions of cranberry juice: a double blind, randomized placebo-controlled cross over trial*”, *World J. Urol.*, 24:21-27.
- [285] Tempera G., Corsello S., Genovese C., Caruso F.E., Nicolosi D. (2010). “*Inhibitory activity of cranberry extracts on the bacterial adhesiveness in the urine of women: an ex-vivo study*”, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol.23(2); p. 611-

618, ISSN: 0394-6320.

- [286] Blatherwick N.R.L., Louisa M. (1923), "*Studies of urinary acidity. II. The increased acidity produced by eating prunes and cranberries*", *Journal of biological chemistry*, 57:815-818.
- [287] Johnson J.R. (2003), "*Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection*", *Infectious disease clinic N. A.*, 17(2):261-278.
- [288] Sabota A.E. (1984), "*Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections*", *Journal of Urology*, 131:1013-1016.
- [289] Liu Y., Black M.A., Caron L., Camesano A (2005), "*Role of cranberry juice on molecular scale surface characteristics and adhesion behavior of Escherichia Coli*", *Biotechnology and Bioengineering*, In progress.

BIBLIOGRAFIA FIGURE

- [Fig. 1]** Rhoades R., Pflanzner R. (1998), *“Fisiologia Umana”*, I edizione, Padova, *Piccin Nuova Libreria S.p.a.*; p. 706.
- [Fig. 2]** Rhoades R., Pflanzner R. (1998), *“Fisiologia Umana”*, I edizione, Padova, *Piccin Nuova Libreria S.p.a.*, p. 707.
- [Fig. 3]** Gupta K., Hooton T.M., Stamm W.E. (2001), *“Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections”*, *Ann. Int. Med.*, 135:41-50.
- [Fig. 4]** Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Ertler M.E. editors (2009), *“Essentials of Glycobiology”*, 2n edition, *Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Chapter 39.
- [Fig. 5]** Puorger C., Eidam O., Capitani G., Erilov D., Grütter M.G., Glockshuber R. (2008), *“Infinite Kinetic Stability against Dissociation of Supramolecular Protein Complexes through Donor Strand Complementation”*, *Structure, Elsevier*, 16(4):631-642.
- [Fig. 6]** Mulvey *et al.* (2000), *PNAS*, 97(16):8830.

- [Fig. 7] Beilstein J., *Org. Chem.* (2010), 6:801–809.
- [Fig. 8] *Nature Reviews Microbiology* (2010), 8:26-38.
- [Fig. 9] *European Journal of Clinical Investigation* (2008), 38(S2):2–11
- [Fig. 10] *Current Opinion in Microbiology* (2005), 8:54–59
- [Fig. 11] Xiang-Qi Mu, E. Bullitt (2006), “*PNAS*”, 26:9861-9866.
- [Fig. 12] *Org. Biomol. Chem.* (2007), 5:1827–1834.
- [Fig. 13] Wiles T.J. et al. (2008), “*Experimental and Molecular Pathology*”, 85:11–19.
- [Fig. 14] Van Houdt R., Michiels C.W. (2005), “*Research in Microbiology*”, 156:626–633.
- [Fig. 15] <http://www.herbaextractsplus.com/cranberry.cfm>
- [Fig. 16-21] © C. Genovese.
- [Fig. 22] Rugarli C. (2010), “*Medicina Interna Sistemica*”, VI edizione, Elsevier, pp. 847-850.
- [Fig. 23,24] © C. Genovese.

BIBLIOGRAFIA GRAFICI

[Graf. 1] Crepaldi G., Baritussio A. (2003), *“Trattato di Medicina Interna”*, Padova, *Piccin Nuova Libreria S.p.a.*, 3:3601.

[Graf. 2] Rossi A., Arcoraci V., Caputi A.P., Nicoletti G., Schito G.C. (2004), *“I risultati dello studio IceA”*, *SIMG*, 2:14-19.

[Graf. 3] Thomas J.K. (1998), *Antimicrobial Agents Chemother.*, 42:521-527.

[Graf. 4-6] © C. Genovese.

BIBLIOGRAFIA TABELLE

[**Tab. 1**] Lotti T., Mirone V., Imbimbo C. (2006), *“Infezioni del tratto urinario: cosa c'è di nuovo”*, Pacini Editore.

[**Tab. 2, 3, 4**] Livermore D.M., Winstanley T.G., Shannon K.P. (2001), *“Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes”*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 48(Suppl. S1):87-102.

[**Tab. 5**] *Cellular Microbiology* (2002), 4(5):257–271.

[**Tab. 6**] © C. Genovese.

[**Tab. 7**] Tempera G., Corsello S., Genovese C., Caruso F.E., Nicolosi D. (2010). *“Inhibitory activity of cranberry extracts on the bacterial adhesiveness in the urine of women: an ex-vivo study”*, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol.23(2); p. 611-618, ISSN: 0394-6320.