

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 06A2

Settore Scientifico disciplinare: MED/04

PATOGENESI MOLECOLARE DELLE OSTEOMIELITI
ASSOCIATE ALL'IMPIANTO

Presentata da: Francesca Testoni

Coordinatore Dottorato

Prof. Pier-Luigi Lollini

Relatore

Prof.ssa Carla Renata Arciola

Esame finale anno 2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1 Osteomielite	2
1.2 Osteomielite associata all'impianto	3
1.3 Epidemiologia dell'osteomielite associata all'impianto	6
1.4 Patogenesi dell'osteomielite associata all'impianto	12
1.5 Internalizzazione	14
1.6 Biofilm	25
1.7 Fagocitosi	34
2. MATERIALI E METODI	40
2.1 Colture cellulari MG-63	40
2.2 Colorazione Rosso di Alizarina	40
2.3 Screening di internalizzazione di isolati clinici	41
2.4 Ottimizzazione del saggio di internalizzazione di isolati clinici	57
2.5 Visualizzazione delle NETs	63
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	66
3.1 Allestimento delle colture cellulari MG-63	66
3.2 Valutazione della mineralizzazione delle cellule MG-63	66
3.3 Internalizzazione di isolati clinici nelle cellule MG-63	67
3.4 Ruolo dell'internalizzazione nella patogenesi dell'osteomielite	82
3.5 Le NETs ed il biofilm	85
4. CONCLUSIONI	88
5. BIBLIOGRAFIA	91

1. INTRODUZIONE

1.1 OSTEOMIELITE

L'osteomielite è una delle patologie infettive più antiche (Klenerman, 2007), infatti la prima evidenza storica risale ad una frattura spinale di un rettile del periodo Permiano vissuto circa 291-250 milioni di anni fa. Appartiene al periodo di Ippocrate (460-370 a. C.) un reperto di infezione associata a frattura ossea, ma la prima descrizione di osteomielite è stata data da Chassaignac nel 1952 (Lew e Waldvogel, 1997; Lindfors ed altri 2010). Il termine osteomielite deriva dal greco *osteon* che significa osso, *-myelo* che significa midollo e *-itis* che indica infiammazione e si riferisce ad un'infezione della cavità midollare dell'osso. Tuttavia, più in generale, l'osteomielite è un processo infiammatorio che coinvolge l'osso e la sua cavità midollare associato a distruzione del tessuto osseo ed è causata da un microrganismo (Lew e Waldvogel, 2004). L'infezione può essere limitata ad una singola porzione dell'osso o può coinvolgere diverse regioni, come la cavità midollare, la corteccia, il periostio e il tessuto molle circostante. Waldvogel, in base alla durata e al meccanismo di infezione, classifica l'osteomielite in: osteomielite ematogena, osteomielite da infezione diretta e per contiguità con o senza insufficienza vascolare, osteomielite vertebrale (Waldvogel et al., 1970).

L'osteomielite ematogena è tipica sia dell'infanzia che dell'età adulta ed è caratterizzata dalla diffusione ematogena del microrganismo infettante (Lew e Waldvogel, 2004).

L'osteomielite vertebrale è spesso secondaria ad un'infezione tubercolare.

L'osteomielite da infezione diretta e per contiguità è associata ad una diffusione locale dell'infezione a partire da una vicina fonte contaminata, come ad esempio una frattura esposta, una ferita profonda o un impianto protesico. In questo caso è l'infezione iniziale che favorisce l'accesso del patogeno all'osso. Di particolare interesse clinico sono le osteomieliti associate all'impianto protesico, sia per la loro elevata suscettibilità all'infezione sia per le gravose complicanze (Lew e Waldvogel, 2004). L'osteomielite

secondaria ad insufficienza vascolare si manifesta nei soggetti affetti da diabete in cui l'infezione ossea si sviluppa a partire dall'ulcera del "piede diabetico".

I foci di osteomielite acuta sono caratterizzati, nel sito di infezione, da infiammazione purulenta. Il danno alla matrice ossea, la compressione e successiva rottura delle strutture vascolari rappresentano una conseguenza della diffusione dell'infezione ai tessuti molli circostanti, aggravando così la necrosi ossea. In seguito alla lesione ischemica, il frammento di osso morto, detto *sequestrum*, rappresenta un focus infettivo isolato e pertanto inaccessibile alle cellule del sistema immunitario e agli antibiotici. L'incapacità da parte delle cellule dell'infiammazione e degli antimicrobici di raggiungere l'area infetta di tessuto necrotico porta alla persistenza cronica dell'infezione e al fallimento del trattamento dell'osteomielite (Lew e Waldvogel, 2004).

1.2 OSTEOMIELITE ASSOCIATA ALL'IMPIANTO

Nel corso degli anni il sempre più diffuso ricorso ad impianti protesici in tutti i campi della chirurgia, al fine di ripristinare funzioni compromesse o trattare malattie severe, ha determinato un drastico aumento del numero di soggetti con dispositivi medicali e, di conseguenza, del rischio di sviluppare un'infezione associata all'impianto. Tali infezioni rappresentano un grave problema clinico che incide pesantemente sull'esito dell'intervento chirurgico, infatti l'eventuale rimozione della protesi costituisce non solo un doloroso inconveniente per il paziente ma anche un costo per il Servizio Sanitario Nazionale (Arciola et al. 2005a; Montanaro et al. 2011a). Nonostante gli sforzi fatti per garantire la sterilità e l'asepsi, per minimizzare la possibilità di contaminazioni durante gli interventi chirurgici e per prevenire l'insorgenza di un'infezione, risulta ancora del tutto impossibile riuscire a fronteggiare questo ingente fenomeno (Arciola et al., 2015). Tuttavia le infezioni legate agli impianti rimangono il

tallone d'Achille dell'applicazione dei biomateriali in campo medico (Arciola et. al, 2005a; Campoccia et al., 2006;). Come aveva già evidenziato Gristina nel 1987, il principale inconveniente nell'uso degli impianti protesici è rappresentato dalla possibile adesione batterica ai biomateriali e dalla conseguente infezione (Gristina, 1987). Infatti i biomateriali impiantati sono tuttora noti per essere facilmente suscettibili alla colonizzazione microbica e pertanto sono capaci di favorire lo sviluppo di infezioni.

Molti sono i materiali utilizzati dalla chirurgia ortopedica: possono variare dai classici materiali metallici, ceramici e polimerici, ai materiali porosi o ai più moderni prodotti dell'ingegneria tissutale (Campoccia et al., 2013). Tuttavia la ricerca di biomateriali in grado di fornire un'ottima resistenza alle infezioni può essere basata solo su un'attenta comprensione delle complesse relazioni tra batteri e biomateriali (Arciola et al., 2012a). In ortopedia le infezioni associate ai biomateriali rappresentano una seria complicanza in quanto possono evolvere in osteomielite con conseguenti effetti devastanti per l'osso e per i tessuti molli circostanti (Arciola et al., 2011a; Montanaro et al., 2011a).

In base al momento di insorgenza, le infezioni associate all'impianto, possono essere classificate in: precoci, ritardate e tardive (Figura 1).

Classification	characteristic
According to the route of infection	
Perioperative	inoculation of microorganisms into the surgical wound during surgery or immediately thereafter
Haematogenous	through blood or lymph spread from a distant focus of infection
Contiguous	contiguous spread from an adjacent focus of infection (eg, penetrating trauma, preexisting osteomyelitis, skin and soft tissue lesions)
According to the onset of symptoms after implantation	
Early infection (<3 months)	predominantly acquired during implant surgery or the following 2 to 4 days and caused by highly virulent organisms (eg, <i>Staphylococcus aureus</i> or gram-negative bacilli)
Delayed or low-grade infection (3–24 months)	predominantly acquired during implant surgery and caused by less virulent organisms (eg, coagulase-negative staphylococci or <i>Propionibacterium acnes</i>)
Late infection (>24 months)	predominantly caused by haematogenous seeding from remote infections

Figura 1: Classificazione delle infezioni associate all'impianto basata sul momento di insorgenza (Trampuz e Zimmerli, 2005).

Le infezioni precoci si sviluppano da una contaminazione durante l'intervento chirurgico o nei primi giorni dopo l'operazione e di solito diventano sintomatiche o comunque manifeste entro tre mesi dall'impianto (Trampuz e Zimmerli, 2005). Questo tipo di infezione è causato prevalentemente da *S. aureus*. Al contrario le infezioni ritardate si manifestano in tempi più lunghi, dopo circa 3-24 mesi dall'intervento chirurgico e di solito sono causate da agenti eziologici meno virulenti, come *S. epidermidis* e altri stafilococchi coagulasi-negativi. Infine le infezioni tardive compaiono dopo più di 24 mesi dall'impianto protesico e sono indipendenti dall'intervento chirurgico, bensì si sviluppano come conseguenza di una diffusione ematogena a partire da distanti siti anatomici (Uçkay et al., 2009).

Un aspetto fondamentale dell'osteomielite associata all'impianto è la formazione del biofilm che consente al microrganismo infettante di eludere le difese messe in atto dal sistema immunitario dell'ospite e le terapie antibiotiche sistemiche. La formazione del biofilm è tipica non solo dei microrganismi patogeni, come *S. aureus*, ma anche dei batteri opportunisti come *S. epidermidis* (Costerton et al., 2005). In seguito all'aggregazione intercellulare i batteri risultano essere imbrigliati in una matrice polimerica che fornisce loro una solida protezione. Pertanto le infezioni associate all'impianto caratterizzate dalla presenza del biofilm sono molto resistenti al trattamento con antibiotici e di conseguenza la rimozione del dispositivo medicale rimane l'unica alternativa possibile (Jones et al., 2001; Arciola et al., 2005b; Arciola et al., 2012a).

Il successo di un impianto ortopedico dipende dall'osteointegrazione, cioè dall'intima unione che si crea tra l'osso e l'impianto stesso; la contaminazione da parte di un patogeno e la successiva diffusione dell'infezione compromette, spesso irreversibilmente, l'esito di un intervento chirurgico di tipo protesico. Infatti, il trattamento d'elezione delle osteomieliti associate all'impianto consiste nella rimozione dell'impianto stesso. In alcuni casi l'impianto viene rimosso e sostituito nella stessa fase

e necessita dell'uso di un cemento antibiotato (Campoccia et al. 2010). In altri casi invece sono necessari due interventi chirurgici, il primo dei quali consiste nella rimozione dell'impianto, nella pulizia chirurgica dell'osso e nell'utilizzo di antibiotici sistemici e locali, mentre nel secondo si realizza l'inserimento di una nuova protesi. Sfortunatamente sono rare le condizioni in cui è possibile debellare l'osteomielite solo con la terapia antibiotica orale basata sull'impiego di rifampicina e chinolonici.

1.3 EPIDEMIOLOGIA DELL'OSTEOMIELITE ASSOCIATA ALL'IMPIANTO

In ortopedia l'uso di impianti protesici per ripristinare le funzioni di articolazioni danneggiate, segmenti ossei fratturati ed arti compromessi è in progressivo aumento. L'espansione della chirurgia di sostituzione protesica e la necessità di monitorare l'esito e i costi delle artroprotesi hanno favorito lo sviluppo di molti registri a livello regionale, nazionale ed internazionale. Tali registri forniscono preziose informazioni circa la qualità degli impianti protesici (Montanaro et al., 2011b, Arciola et. al, 2015). Il numero di revisioni protesiche primarie è in costante aumento in tutto il mondo, infatti le proiezioni riguardanti le revisioni d'anca e di ginocchio da effettuare fino al 2030 in USA sono notevolmente superiori a quelle stimate nel 2005 (Kurtz et al., 2007). Entro il 2030 si stimano 572000 revisioni d'anca e 3,48 milioni revisioni di ginocchio con un incremento rispettivamente del 174% e 673% (Figura 2) (Montanaro et al., 2011b, Arciola et. al, 2015).

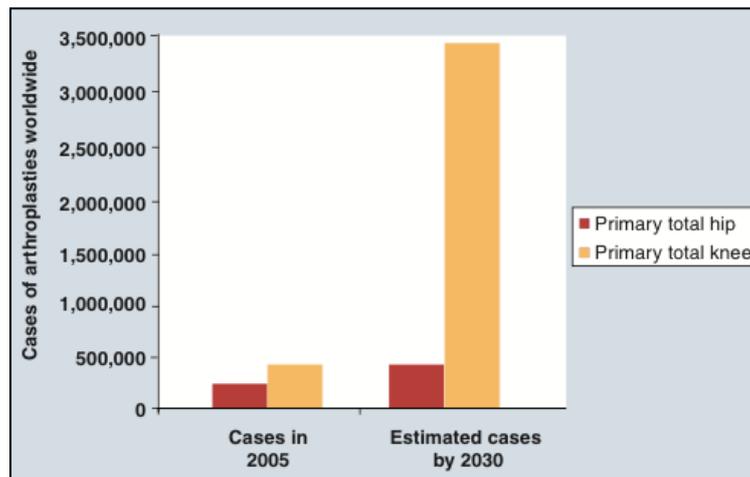


Figura 2: Proiezioni dell'incremento di artroprotesi in USA dal 2005 al 2030 (Montanaro et al., 2011b).

In uno studio condotto su 1027 isolati clinici provenienti da 699 pazienti ortopedici nel periodo 2000-2003, è stata confrontata l'eziologia delle infezioni associate a dispositivi medici (MDs, medical devices) con quella delle infezioni sviluppate in assenza di dispositivi medici (no MDs). I dispositivi medici considerati comprendono le protesi di anca e di ginocchio, i fissatori esterni ed interni, i materiali per la ricostruzione di tendini e legamenti ed altri materiali protesici ortopedici. I principali agenti eziologici delle infezioni ortopediche appartengono al genere *Staphylococcus* (75,3% di tutti gli isolati considerati, 78,1% degli isolati associati a MDs e 68,3% degli isolati associati a no MDs) (Arciola et al., 2005c). Tra le specie appartenenti al genere *Staphylococcus*, *S. aureus* rappresenta il principale agente eziologico (35,5% di tutti gli isolati clinici, 33,8% degli isolati clinici associati a MDs e 40,3% degli isolati clinici no MDs) seguito da *S. epidermidis*, ma solo in presenza di dispositivi medici (31,5%). Nessuna altra specie batterica supera una frequenza del 7%, sottolineando l'importante ruolo di queste due specie stafilococciche nell'epidemiologia delle infezioni ortopediche (Arciola et al., 2005c).

Uno studio più recente condotto su isolati clinici provenienti da 242 pazienti ortopedici nel periodo 2007-2011 ha confermato i risultati osservati precedentemente. Infatti la prevalenza del genere *Staphylococcus* è di circa il 75% nell'intera collezione (82,3% delle infezioni associate a MDs e 65,4% delle infezioni non associate a MDs). L'analisi dettagliata della lista degli agenti eziologici mostra che *S. aureus* rimane la principale causa di infezioni ortopediche (35%) seguito da *S. epidermidis* con una prevalenza del 39% in presenza di dispositivi protesici. Tuttavia altri stafilococchi coagulasi negativi rivestono un ruolo eziologico importante nelle infezioni ortopediche e rappresentano i nuovi patogeni emergenti delle infezioni associate all'impianto (Tabella 1) (Montanaro et al., 2011b).

Microorganism	All		MDs		No MDs	
	n	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	95	35.1	52	31.7	43	40.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	81	29.9	64	39.0	17	15.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	9.2	10	6.1	15	14.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	4.1	4	2.4	7	6.5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	3.3	3	1.8	6	5.6
<i>Escherichia coli</i>	8	3.0	4	2.4	4	3.7
<i>Staphylococcus warneri</i>	8	3.0	8	4.9	0	0.0
<i>Staphylococcus hominis</i>	5	1.8	4	2.4	1	0.9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	1.5	1	0.6	3	2.8
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1.5	2	1.2	2	1.9
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3	1.1	2	1.2	1	0.9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	1.1	1	0.6	2	1.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1.1	2	1.2	1	0.9
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	1.1	1	0.6	2	1.9
<i>Enterococcus faecium</i>	2	0.7	1	0.6	1	0.9
<i>Morganella morganii</i>	2	0.7	2	1.2	0	0.0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0.4	1	0.6	0	0.0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0.4	0	0.0	1	0.9
<i>Serratia spp.</i>	3	1.1	2 [†]	1.2	1 [‡]	0.9
Total:	271		164		107	

[†]*Serratia marcescens* and a still unresolved species of *Serratia*.
[‡]*Serratia liquefaciens*.
MD: Medical devices.

Tabella 1: Etiologia delle infezioni ortopediche di ceppi clinici isolati nel periodo 2007-2011 (Montanaro et al., 2011b).

Inoltre è stato osservato che *S. aureus* rappresenta la principale causa di infezioni non associate a dispositivi medici ortopedici e di infezioni associate a fissatori interni ed esterni, mentre *S. epidermidis* è il principale agente eziologico nelle infezioni associate a protesi di anca e di ginocchio (Figura 3) (Montanaro et al., 2011b).

I dati osservati nei due studi sopracitati confermano quanto osservato in letteratura secondo la quale il 65% delle infezioni associate all'impianto sono causate da *S. aureus* e *S. epidermidis*, tuttavia nella lista degli agenti eziologici si annoverano anche *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterococcus faecalis* (von Eiff et al., 2006a; Arciola et al., 2008). L'elevato impatto eziologico di *S. aureus* e *S. epidermidis* in questo tipo di infezioni è legato alla loro capacità di formare il biofilm sulla superficie dell'impianto con la conseguente colonizzazione dello stesso. La prevalenza di alcuni batteri può variare in casi particolari in cui la protesi impiantata risulta essere in prossimità o a contatto con le mucose, piuttosto che con la cute, in quanto esse creano le condizioni per un aumentato rischio di contaminazione da parte della flora locale. L'eziologia delle infezioni associate all'impianto è complessa poiché può essere influenzata da molte variabili come il tipo di protesi, la regione anatomica interessata e la modalità di accesso che può essere percutanea o interna (Campoccia et al., 2009a).

Staphylococcus aureus ha elaborato parecchie strategie che lo rendono l'agente eziologico d'eccellenza nelle osteomieliti umane. L'elevata natura clonale di *S. aureus*, descritta da diversi autori in recenti studi di epidemiologia molecolare, sottolinea la versatilità di questo batterio. Guidato da una potente spinta selettiva, *S. aureus* si è evoluto in numerosi cloni, alcuni dei quali rari e perciò definiti "sporadici", al contrario di altri che, per la loro elevata prevalenza, sono indicati come "epidemici" (Campoccia et al., 2008). Il fatto che cloni differenti di uno stesso microorganismo manifestino un successo maggiore diventando epidemici o addirittura pandemici, indica una sostanziale differenza in termini di fattori virulenti, come le tossine stafilococciche e l'antibiotico-resistenza, che sicuramente giocano un ruolo fondamentale, seppur ancora non del tutto

chiaro, nel definire differenti spettri di virulenza (Feng et al., 2008). I molteplici cloni sono in continuo divenire, nel senso che quelli più frequenti sono rapidamente sostituiti da altri emergenti.

La crescente incidenza di stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA) rappresenta un grave problema per il trattamento dell'osteomielite in quanto l'antibiotico-resistenza costituisce un ostacolo per una terapia specifica aumentando, di conseguenza, il rischio di cronicizzazione della malattia. Di particolare interesse medico sono i ceppi di *S. aureus* comunitari (Methicillin-resistant community-acquired, CA-MRSA) la cui diffusione è iniziata circa vent'anni fa come fenomeno sporadico per raggiungere, negli ultimi anni, livelli epidemici in alcune regioni.

Lo sviluppo dell'osteomielite dipende non solo dalle caratteristiche del microrganismo patogeno ma anche dall'immunocompetenza e dalle condizioni generali dell'ospite (Lew e Waldvogel, 2004). Infatti le infezioni ospedaliere da *S. aureus* sono particolarmente frequenti in soggetti immunocompromessi e gravemente debilitati e prevalgono in presenza di impianti medicali permanenti (Arciola et al., 2005a).

Le infezioni associate all'impianto persistenti e refrattarie al trattamento antibiotico sono spesso caratterizzate da forme varianti di *S. aureus*, conosciute con il nome di "small colony variants", SCVs (von Eiff et al., 2006b). Queste forme mutanti sono dotate di un successo adattativo che consente loro la colonizzazione persistente dell'osso. Il fenotipo SCV è caratterizzato da una crescita lenta, da colonie circolari circa dieci volte più piccole rispetto alle forme *wild-type*, da un'augmentata resistenza agli antibiotici aminoglicosidici e da una ridotta attività emolitica responsabile della persistenza intracellulare del batterio (Sendi e Proctor, 2009).

Lo studio dei meccanismi patogenetici delle infezioni associate agli impianti si basa sulla stretta interdipendenza tra l'epidemiologia molecolare e la biologia molecolare (Montanaro et al., 2007). Uno dei primi lavori sull'epidemiologia molecolare delle infezioni associate all'impianto risale al 1999 e dimostra l'elevata prevalenza di biofilm

formatori tra gli isolati clinici di infezioni ortopediche (Montanaro et al., 1999). Studi successivi hanno sottolineato la prevalenza dell'adesina che lega il collagene (*Cna*) e delle due adesine che legano la fibronectina, *FnbPA* e *FnbPB*, nei ceppi di *S. aureus* isolati da infezioni associate a diversi tipi di impianto (Arciola et al., 2005d). Infatti lo studio condotto da Arciola e i suoi collaboratori su 191 isolati clinici di *S. aureus* ha dimostrato che i geni per le *FnbPs* sono presenti nella stragrande maggioranza dei ceppi analizzati: il 98,4% degli isolati risultava essere *fnbA+*, il 99,5% *fnbB+* e il 99,5% possedeva entrambi i geni. Il gene *cna* era presente nel 46% dei ceppi (Arciola et al., 2005d). In uno studio precedente Thomas analizzando 159 ceppi provenienti da due diverse regioni geografiche, rispettivamente 102 dal Regno Unito e 57 dalla Nuova Zelanda, ha osservato una differente prevalenza del gene *cna* nelle due regioni (67% nel Regno Unito e 44% nella Nuova Zelanda) (Thomas et al., 1999). In un altro studio condotto nel Regno Unito su 155 isolati clinici, Peacock ha evidenziato una prevalenza del *cna* del 52% (Peacock et al., 2002). Inoltre sempre Peacock, analizzando 29 isolati clinici provenienti da infezioni ortopediche associate all'impianto, ha descritto che il 96,6% era *fnbA+* e il 79,3% era *fnbB+* (Peacock et al., 2000). Precedenti studi condotti nel Nord America hanno riportato una prevalenza del gene *cna* del 43% (Holderbaum et al., 1987), mentre, in Svezia, Ryding ha dimostrato una prevalenza del 57% negli isolati provenienti da pazienti affetti da endocarditi o batteriemia associata a infezione ossea o articolare (Ryding et al., 1997). Si ipotizza che queste variazioni nella prevalenza possano essere associate o alle specifiche regioni geografiche o, alternativamente, alle differenti tecniche metodologiche. La conoscenza dei tratti molecolari caratteristici dei cloni epidemici, causa delle infezioni associate all'impianto, è di fondamentale importanza per la scoperta di nuove strategie terapeutiche (Montanaro et al., 2007).

1.4 PATOGENESI DELL'OSTEOMIELITE ASSOCIATA ALL'IMPIANTO

Lo sviluppo degli impianti protesici è stato uno dei successi più importanti in campo medico del ventesimo secolo. Tuttavia nonostante i notevoli miglioramenti ottenuti nelle tecniche chirurgiche, l'impianto di dispositivi medici è strettamente associato ad un elevato rischio di infezioni batteriche (Moreillon et al., 2005).

La patogenesi delle infezioni associate all'impianto presenta delle caratteristiche peculiari. Innanzitutto, a livello dell'interfaccia tessuto-materiale, si crea il cosiddetto *locus minoris resistentiae* in cui le cellule del sistema immunitario dell'ospite risultano essere inefficienti (Arciola et al., 2005a). In secondo luogo il materiale fornisce un supporto per l'ancoraggio del microrganismo e la conseguente formazione del biofilm (Costerton et al., 2005). Inoltre il materiale costituisce una protezione sia nelle nicchie superficiali sia nei pori più interni, ed infine offre i nutrienti che possono accelerare la crescita del patogeno (Beech et al., 2006); in particolare i materiali metallici sono in grado di rilasciare alcuni ioni utili al microrganismo per i processi metabolici. A livello dell'interfaccia tessuto-materiale si crea una "lotta per la superficie" che coinvolge le proteine della matrice extracellulare, le cellule dell'ospite (fibroblasti, osteoblasti, cellule endoteliali) e i batteri. Una volta impiantata nello specifico distretto anatomico, la superficie protesica acquisisce un sottile strato di proteine della matrice extracellulare (matrice condizionata) in seguito all'esposizione ai fluidi dell'ospite. La matrice extracellulare è uno strato biologicamente attivo costituito da un complesso insieme di macromolecole diverse, come la fibronectina, il fibrinogeno, l'albumina, la vitronectina e il collagene. L'adesione, la migrazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule dell'ospite sono fenomeni direttamente collegati alla composizione e all'organizzazione strutturale della circostante ECM. L'interazione tra le cellule ospiti e la matrice extracellulare è mediata da recettori specifici, le integrine, che consentono il legame tra il citoscheletro della cellula eucariotica e le proteine della ECM (Ruoslahti, 1991). Ma la matrice extracellulare non fornisce solo un substrato per le cellule dell'ospite ma favorisce anche la colonizzazione da parte dei batteri. Infatti è stato

dimostrato che *S. aureus* è dotato di molte adesine di superficie (MSCRAMMs, *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) attraverso le quali è in grado di interagire con le proteine della ECM dell'ospite e con la superficie condizionata degli impianti (Patti et al., 1994). In questo modo *S. aureus* riesce ad aderire alla superficie dell'impianto colonizzandolo.

L'adesione batterica e la conseguente colonizzazione dei tessuti dell'ospite rappresentano la fase più critica della patogenesi delle infezioni causate da *S. aureus*. Il fatto che l'osso rappresenti per *S. aureus* un bersaglio d'elezione è legato alla capacità del patogeno di aderire al tessuto osseo mediante alcuni recettori, le *adesine*, capaci di interagire con i componenti della matrice ossea, come ad esempio la fibronectina (Hermann et al., 1988), il collagene (Patti et al., 1993) e la sialoproteina ossea (Ryden et al., 1987), favorendo così il legame e il successivo ingresso nelle cellule ospiti. Le adesine di *S. aureus* giocano un ruolo importante in vari processi della patogenesi infettiva, come il tropismo, l'invasione, l'internalizzazione cellulare e, nei tessuti peri-impianto, l'adesione batterica ai biomateriali ricoperti dalle proteine della matrice extracellulare (ECM) dell'ospite (Patti e Höök, 1994; Campoccia et al., 2009b). Una volta colonizzato il tessuto ospite, *S. aureus*, grazie al suo arsenale di fattori di virulenza, è in grado di innescare un'infezione ossea acuta.

La patogenesi delle osteomieliti associate all'impianto si basa su due concetti fondamentali: l'internalizzazione del patogeno all'interno degli osteoblasti (Arciola et al., 2012b) e la capacità dei batteri di formare il biofilm (Costerton et al., 1999; Costerton et al., 2005; Brady et al., 2008, Arciola et al., 2012a).

1.5 INTERNALIZZAZIONE

L'ingresso di un patogeno nelle cellule eucariotiche gioca un ruolo importante nella comprensione della patogenesi delle malattie infettive a livello cellulare; questo processo è noto come invasione batterica (Finlay and Cossart, 1997). L'invasione di cellule eucariotiche ospiti da parte di un patogeno rappresenta un meccanismo molto efficace che previene l'eliminazione del batterio e allo stesso tempo sostiene l'infezione (Kubica et al., 2008). L'internalizzazione pertanto rappresenta per il batterio un'ottima strategia per eludere la sorveglianza immunologica messa in atto dall'ospite e la terapia antibiotica, favorendo in questo modo la persistenza del microrganismo nell'ospite (Hauck and Ohlsen, 2006). L'internalizzazione contribuisce alla persistenza intracellulare del batterio e sembra essere un aspetto fondamentale del processo infettivo, infatti i batteri intracellulari rappresentano un reservoir di *S. aureus* che spiega gli episodi ricorrenti di osteomielite cronica (Sinha and Fraunholz, 2010; Tuchscher et al., 2010). Sebbene per molto tempo *S. aureus* sia stato considerato un patogeno extracellulare, recenti studi hanno evidenziato la capacità del patogeno di invadere fagociti non professionali come le cellule epiteliali ed endoteliali, i fibroblasti, gli osteoblasti e i cheratinociti (Jevon et al., 1999; Massey et al., 2001; Agerer et al., 2003; Kintarak et al., 2004; Testoni et al., 2011). L'invasione delle cellule eucariotiche è stata osservata non solo per *S. aureus* ma anche per *Staphylococcus epidermidis* (Khalil et al., 2007; Hirschhausen et al., 2010; Valour et al., 2013), *Staphylococcus lugdunensis* (Szabados et al., 2011; Hussain et al., 2014) ed *Enterococcus faecalis* (Millán et al., 2013).

CONSEGUENZE DELL'INTERNALIZZAZIONE

La capacità di *S. aureus* di sopravvivere all'interno delle cellule eucariotiche può spiegare parecchi aspetti delle infezioni stafilococciche croniche, come ad esempio l'osteomielite cronica caratterizzata da episodi ricorrenti (Lowy, 1998). Le infezioni

stafilococciche sono associate alla morte del tessuto infettato e le evidenze sperimentali dimostrano l'induzione dell'apoptosi cellulare mediata dai batteri intracellulari. Infatti è stata documentata l'apoptosi indotta da *S. aureus* di osteoblasti (Tucker et al., 2000), cheratinociti (Nuzzo et al., 2000), cellule epiteliali (Wesson et al., 2000) ed endoteliali (Menzies and Kourteva, 2000). Wesson e i suoi collaboratori hanno dimostrato che i protagonisti dell'apoptosi mediata da *S. aureus* sono le caspasi 8 e 3 della cellula infettata (Wesson et al., 2000).

Il coinvolgimento della caspasi 8 è supportato dall'evidenza che *S. aureus* induce l'espressione negli osteoblasti infettati del ligando TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Alexander et al., 2001). TRAIL è un membro della superfamiglia del TNF (tumor necrosis factor) che, in seguito al legame con il recettore contenente il dominio di morte, induce l'attivazione della caspasi 8, preludio della conseguente apoptosi (Ashkenazi e Dixit, 1998). Inoltre *S. aureus* induce l'attivazione degli osteoclasti favorendo il "sequestro" del regolatore negativo dell'osteoclastogenesi, l'osteoprotegerina (OPG) (Emmery et al., 1998) (Figura 3).

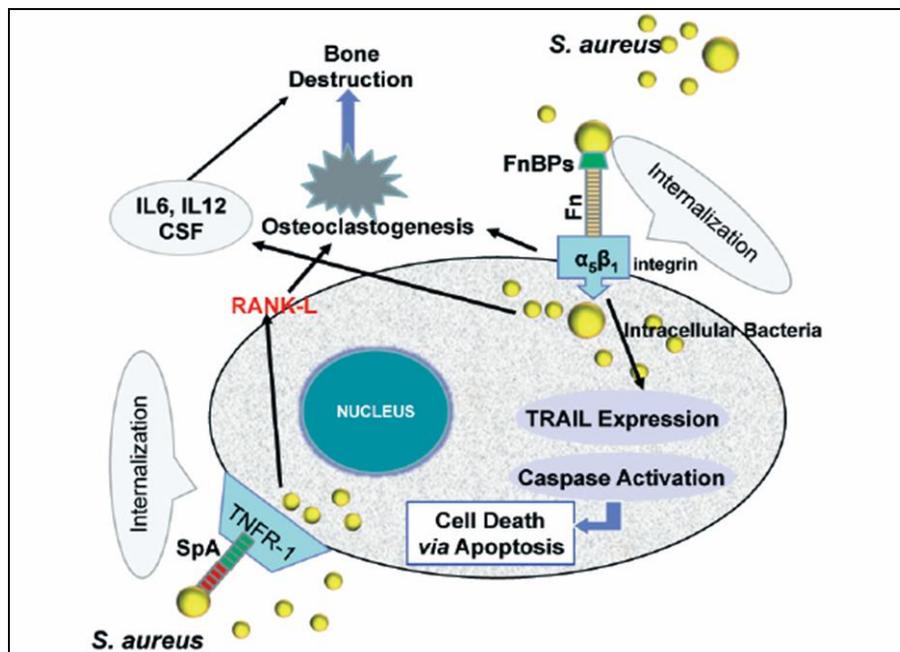


Figura 3: Conseguenze dell'internalizzazione di *S. aureus* all'interno degli osteoblasti (Montanaro et al., 2011a).

L'osteomielite è una patologia infettiva dell'osso caratterizzata da una progressiva distruzione infiammatoria del tessuto osseo (Sax and Lew, 1999); il rimodellamento dell'osso richiede un equilibrio continuo e coordinato tra la sintesi ossea, mediata dagli osteoblasti, e il riassorbimento osseo operato dagli osteoclasti (Akatsu et al., 1991; Kobayashi et al., 2005).

Gli osteoblasti producono anche fattori che modulano la formazione e l'attività degli osteoclasti, come il ligando del recettore attivante dell'NF- κ B (RANK-L). L'interazione tra RANK-L sulla superficie degli osteoblasti e RANK sulla superficie degli osteoclasti, stimola il differenziamento di questi ultimi e la loro successiva attivazione (Wada et al., 2006). Un incremento nella produzione di RANK-L da parte degli osteoblasti può ulteriormente portare al differenziamento e all'attivazione degli osteoclasti, che può potenziare la distruzione ossea (Somayaji et al., 2008). I patogeni batterici possono, direttamente o indirettamente, stimolare l'osteoclastogenesi, che incrementa il

riassorbimento osseo, favorendo la distruzione ossea (Meghji et al., 1998). Montonen e i suoi collaboratori hanno evidenziato elevati livelli di RANK-L nelle lesioni ossee di osteomielite mandibolare (Montonen et al., 2006); mentre Alexander ed i suoi collaboratori hanno osservato un incremento dell'espressione di TRAIL sulla superficie degli osteoblasti infettati con *S. aureus* (Alexander et al., 2001). L'osteoprotegerina (OPG) è un regolatore negativo dell'osteoclastogenesi ed è prodotto e secreto dagli osteoblasti (Simonet et al., 1997). L'OPG lega sia TRAIL che RANK-L, di conseguenza questa competizione può limitare la quantità di OPG disponibile per bloccare l'interazione tra RANK-L e RANK durante l'infezione degli osteoblasti da parte di *S. aureus* (Somayaji et al., 2008). Recentemente Claro e i suoi collaboratori hanno dimostrato che, l'interazione tra la proteina batterica SpA e TNFR-1 sulla superficie degli osteoblasti responsabile di un emergente meccanismo di internalizzazione di *S. aureus*, è associata ad un aumento considerevole dell'espressione di RANK-L. Inoltre il legame tra SpA e TNFR-1 scatena una serie di segnali multipli a livello cellulare che comportano l'inibizione della mineralizzazione e della proliferazione degli osteoblasti, l'induzione dell'apoptosi degli osteoblasti mediata dalla caspasi 3 e il rilascio di mediatori capaci di indurre il riassorbimento osseo attivando l'osteoclastogenesi (Figura 4) (Claro et al., 2011).

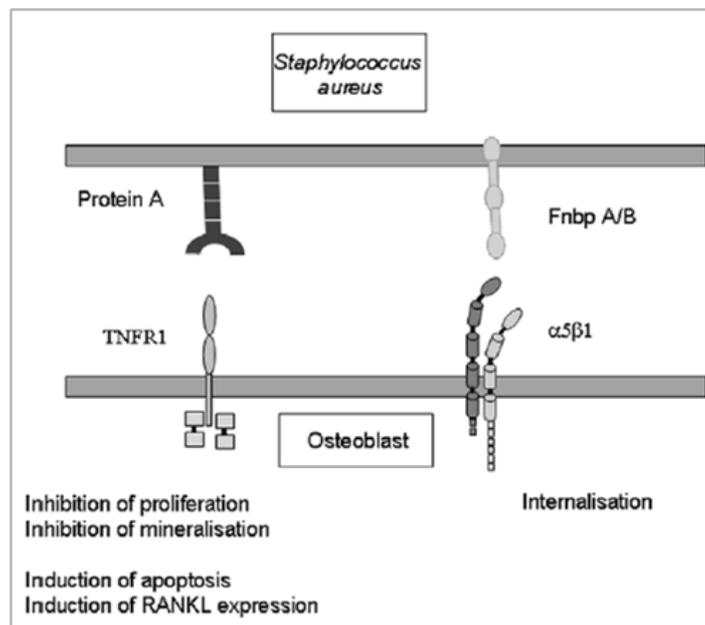


Figura 4: Modello di interazione tra gli osteoblasti e *S. aureus* (Claro et al., 2011).

È evidente pertanto che i batteri possono indurre l'osteolisi attraverso diversi meccanismi, come la produzione di acidi o proteasi o, indirettamente, stimolando l'osteoclastogenesi. Molti studi hanno dimostrato che le proteine stafilococciche di superficie hanno un potente effetto osteolitico (Nair et al., 1995; Nair et al., 1997; Megji et al., 1997). Gli osteoblasti tuttavia possono produrre citochine come IL-1 (Li et al., 1991; Pivrotto et al., 1995), IL-6 (Li et al., 1991; Lowik et al., 1989; Ishimi et al., 1990; Littlewood-Evans et al., 1997), TNF- α (Littlewood-Evans et al., 1997) e IL-18 (Udagawa et al., 1997), tutte in grado di modulare l'attività degli osteoclasti. Bost e i suoi collaboratori (Bost et al., 1999) hanno dimostrato che gli osteoblasti infettati con *S. aureus* producono elevati livelli di IL-6 in grado di modulare l'attività degli osteoclasti direttamente o indirettamente (Kaneda et al., 2000; Suda et al., 2004). Inoltre è stato osservato che l'IL-6 prodotta dagli osteoblasti infettati induce l'espressione della ciclossigenasi 2 (COX-2) e di conseguenza delle prostaglandine E2 (PGE2) in grado di favorire l'espressione di RANK-L a livello degli osteoblasti e quindi di promuovere il

riassorbimento osseo (Somayaji et al., 2008). Queste citochine non hanno solo una funzione osteolitica ma giocano anche un ruolo importante nella regolazione delle risposte immunitarie. Gli osteoblasti infettati con *S. aureus* sono in grado di produrre, nel sito dell'infezione ossea, vari fattori di crescita, come il fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi (GM-CSF) (Modrowski et al., 1997), il fattore di crescita dei granulociti (G-CSF) (Takamatsu Y, et al., 1998) e il fattore di crescita dei macrofagi (M-CSF) (Weir et al., 1993). È stato dimostrato che il M-CSF (Kodama et al., 1991) e il G-CSF (Takamatsu Y, et al., 1998) sono in grado di favorire l'osteoclastogenesi promuovendo il riassorbimento osseo, mentre il GM-CSF è coinvolto nel differenziamento iniziale degli osteoclasti (Liggett et al., 1993). Inoltre questi fattori di crescita prendono parte allo sviluppo della risposta infiammatoria alle infezioni da *S. aureus* (Frenck et al., 1990; Dale et al., 1995).

MECCANISMI DI INTERNALIZZAZIONE NEI FAGOCITI NON PROFESSIONALI

L'adesione batterica alle cellule ospiti rappresenta il prerequisito per la successiva internalizzazione. Le adesine stafilococciche possono essere suddivise in due classi differenti: la famiglia delle MSCRAMMs e la famiglia delle autolisine/adesine. Le MSCRAMMs sono proteine poste sulla superficie batterica, note anche con il termine di *adesine*, in grado di legare componenti della matrice extracellulare dell'ospite come ad esempio la fibronectina, il fibrinogeno, il collagene (Hirschhausen et al., 2010). Una volta impiantata nello specifico distretto anatomico, la superficie protesica acquisisce un sottile film di ECM condizionata (Baier et al., 1984); pertanto la ECM non solo rappresenta un substrato per le cellule ospiti ma favorisce anche la colonizzazione protesica operata dai batteri (Patti and Hook, 1994; Francois et al., 1996). Le autolisine/adesine sono proteine dotate di attività adesiva ed enzimatica (idrolisi del peptidoglicano) (Hirschhausen et al., 2010); a questo gruppo appartengono l'Atl di *S.*

aureus (Foster, 1995), l'AtlE di *S. epidermidis* (Heilmann et al., 1997) e l'AtlL di *S. lugdunensis* (Bourgeois et al., 2009).

I meccanismi molecolari alla base dell'internalizzazione dei batteri nei fagociti non professionali sono altamente specifici e oggetto di numerose e continue investigazioni. Di seguito vengono descritte le principali strategie invasive dei batteri maggiormente implicati nelle osteomieliti.

Staphylococcus aureus

S. aureus è senza dubbio uno tra i patogeni più rappresentativi e più difficili da eradicare. *S. aureus* è una delle principali cause di osteomieliti croniche associate agli impianti protesici (Lentino, 2003). Le adesine di *S. aureus* sono ancorate alla parete cellulare mediante il motivo LPXTG o alternativamente, in seguito alla loro secrezione, si legano alla superficie mediante interazioni non covalenti. Le principali MSCRAMMs di *S. aureus*, come ad esempio le proteine che legano la fibronectina (FnBPs), l'adesina che lega il collagene (Cna) e il clumping factor A (ClfA) sono state ben caratterizzate e si ritiene che siano coinvolte nelle fasi iniziali di adesione al tessuto ospite (McDevitt et al., 1994; Patti et al., 1994; Hauck and Ohlsen, 2006; Foster and Hook, 1998; Arciola et al., 2011b). Le proteine SERAM (SERAMs, *Secreted Expanded-Repertoire Adhesive Molecules*), come la proteina di adesione extracellulare (Eap), la proteina che lega la matrice extracellulare (Emp) e la proteina che lega il fibrinogeno extracellulare (Efb), giocano un ruolo importante nell'avvio della malattia (Palma et al., 1999; Hussain et al., 2001a; Lee et al., 2004). La capacità di *S. aureus* di penetrare all'interno dei fagociti non professionali è uno dei principali fattori patogenetici alla base delle infezioni persistenti e recidivanti. Sebbene ultimamente siano stati descritti vari eventi molecolari che determinano l'ingresso di *S. aureus* nelle cellule ospiti (Figura 5), per molto tempo si è ritenuto che il meccanismo esclusivo di internalizzazione coinvolgesse le proteine che legano la fibronectina, FnBPA e FnBPB: l'interazione tra le FnBPs batteriche e l'integrina $\alpha 5\beta 1$ cellulare, mediata da una molecola ponte, la fibronectina della ECM, determina l'ingresso actina-dipendente di *S. aureus* nella cellula ospite mediante

vescicole fagocitiche. Le integrine pertanto fungono da recettori cellulari coinvolti nella trasduzione del segnale che porta ai riarrangiamenti del citoscheletro necessari per l'internalizzazione batterica (Sinha et al., 1999; Fowler et al., 2000; Schwarz-Linek et al., 2004). Le FnBPs possono anche legare la *heat shock protein 60* (Hsp60) che può agire come un co-recettore nell'ingresso di *S. aureus* mediato da FnBP (Dziewanowska et al., 2000). L'importanza delle FnBPs nel processo di internalizzazione di *S. aureus* è stata ampiamente dimostrata in letteratura (Sinha et al., 2000; Ahmed et al., 2001; Edwards et al., 2010; Testoni et al., 2011) ed è enfatizzata dalla diffusa prevalenza delle FnBPs tra gli isolati clinici (Peacock et al., 2000; Arciola et al., 2005d). Successivamente Hussain e i suoi colleghi hanno dimostrato l'importante ruolo che la Eap svolge nell'adesione di *S. aureus* alle cellule eucariotiche (Hussain et al., 2008). Un meccanismo alternativo di ingresso di *S. aureus* nei fagociti non professionali coinvolge l'autolisina/adesina Atl e la Hsc70 come recettore della cellula ospite (Hirschhausen et al., 2010). In uno studio molto recente è stata dimostrata l'importanza dell'interazione tra SpA di *S. aureus* e TNFR-1 sulla superficie degli osteoblasti nell'adesione di *S. aureus* alle cellule ospiti (Figura 4) (Claro et al., 2011). Infine, Pls (plasmin sensitive) è una MRSA proteina di superficie la cui espressione è associata ad una diminuzione della capacità invasiva degli isolati MRSA (Juuti et al., 2004; Hussain et al., 2009).

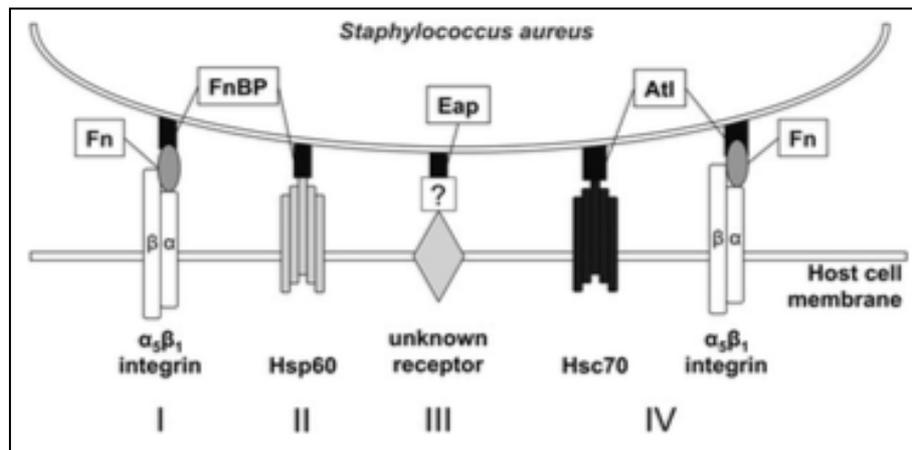


Figura 5: Modelli di internalizzazione di *S. aureus* in fagociti non professionali (Hirschhausen et al., 2010).

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis è un saprofito della cute che raramente causa infezioni patologiche nei soggetti sani. Nonostante ciò, è uno dei più frequenti stafilococchi coagulasi-negativi isolati da pazienti con osteomieliti croniche e con infezioni associate agli impianti (De Wit et al., 1993; Galdbart et al., 1999; Carek et al., 2001). Sebbene *S. epidermidis* possiede molte adesine associate alla parete cellulare in grado di interagire con le proteine della matrice extracellulare, ci sono ancora poche informazioni circa i meccanismi alla base dell'internalizzazione di *S. epidermidis* nei fagociti non professionali. Le principali MSCRAMMs di *S. epidermidis* capaci di mediare l'adesione alla ECM e caratterizzate a livello C-terminale dal motivo LPXTG, sono le proteine Sdr (serine-aspartate repeat), come SdrF (Arrecubieta et al., 2007) che media l'adesione al collagene di tipo I e SdrG (Ponnuraj et al., 2003) che promuove l'adesione al fibrinogeno, Bap (Cuccarella et al., 2001) e la proteina associata all'accumulo Aap (Hussain et al., 1997). Inoltre *S. epidermidis* esprime una varietà di proteine non-LPXTG, come l'autolisina AtlE (Heilmann et al., 1997), capace di legare la vitronectina e Aae (Heilmann et al., 2003; Rupp et al., 2001) che media l'adesione

alla vitronectina e alla catena β del fibrinogeno. La proteina Ebp (Park et al., 1996), la lipasi extracellulare (Bowden et al., 2002) e la proteina Embp (Williams et al., 2002), promuovono l'adesione, rispettivamente, all'elastina, al collagene e alla fibronectina. Inoltre è stato dimostrato che l'acido teicoico è in grado di legare la fibronectina (Hussain et al., 2001b), mentre il polisaccaride PIA promuove l'adesione alla plastica dei cateteri (Tojo et al., 1988). Partendo dall'evidenza sperimentale secondo la quale *S. epidermidis* è in grado di legare la fibronectina (Arciola et al., 2003; Williams et al., 2002), inizialmente si pensava che il meccanismo alla base dell'ingresso di *S. epidermidis* nei fagociti non professionali fosse simile a quello osservato in *S. aureus* mediato da FnBP. Tuttavia Khalil e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'internalizzazione degli osteoblasti operata da *S. epidermidis* non coinvolge l'interazione tra la fibronectina e l'integrina $\alpha 5\beta 1$ (Khalil et al., 2007). Tuttavia in uno studio più recente è stato dimostrato che l'internalizzazione di *S. epidermidis* coinvolge l'autolisina AtlE e il recettore cellulare Hsc70 (Hirschhausen et al., 2010). L'invasione mediata dalle autolisine/adesine rappresenta il meccanismo predominante, o forse l'unico, coinvolto nell'internalizzazione di *S. epidermidis* in fagociti non professionali. Tuttavia essendo stato dimostrato anche in *S. aureus* un'invasione Atl-dipendente, tale meccanismo potrebbe rappresentare un meccanismo di internalizzazione universale per gli stafilococchi (Hirschhausen et al., 2010).

Staphylococcus lugdunensis

Staphylococcus lugdunensis è uno stafilococco coagulasi-negativo (CNS) descritto per la prima volta da Freney nel 1988 (Freney et al., 1988). Gli stafilococchi coagulasi-negativi, spesso saprofiti della pelle, storicamente sono stati considerati innocui o raramente patogeni opportunisti, con una bassa virulenza (Huebner and Goldmann, 1999). Tuttavia l'importanza dei CNS come patogeni, con particolare interesse per le infezioni associate ai dispositivi medici, sta diventando considerevole (Diekema et al., 2001; Frank et al., 2008); infatti *S. lugdunensis* rappresenta una frequente causa di infezioni ossee associate ad impianti (Frank et al., 2008; Klotchko et al., 2011). Sebbene

precedentemente sia stato descritto come un “lupo travestito da pecora”, *S. lugdunensis* si sta rivelando un patogeno formidabile dotato di un potenziale patogenetico simile a quello di *S. aureus*. *S. lugdunensis* possiede un arsenale di proteine di superficie responsabili dell’adesione a vari tipi di cellule ospiti e a diversi dispositivi medici (Frank et al., 2008). Le principali adesine di *S. lugdunensis* descritte sono: la proteina che lega il fibrinogeno (Fbl), la proteina che lega il fattore di von Willebrand (Vwbl) e l’autolisina/adesina AtlL in grado di interagire con varie proteine della matrice extracellulare come la fibronectina, il fibrinogeno e la vitronectina. Le regioni N2 e N3 di Fbl mostrano una elevata similarità con il ClfA di *S. aureus* (Mitchell et al., 2004; Geoghegan et al., 2010a), mentre Vwbl è omologa a SpA (Donvito et al., 1997). E’ stata dimostrata la capacità di *S. lugdunensis* di invadere le cellule endoteliali ed epiteliali, tuttavia non è ancora chiaro il meccanismo di internalizzazione del batterio (Szabados et al., 2011; Hussain et al., 2014). Tuttavia sebbene sia stato escluso il coinvolgimento di Fbl nell’invasione delle cellule ospiti da parte di *S. lugdunensis* (Szabados et al., 2011), sembra che AtlL giochi un ruolo chiave nell’ingresso di *S. lugdunensis* nelle cellule endoteliali (Hussain et al., 2014).

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis è un batterio gram-positivo normalmente commensale dell’intestino umano, tuttavia l’attenzione verso le infezioni causate da enterococchi è aumentata da quando essi rappresentano la quarta causa di infezioni nosocomiali negli Stati Uniti (Emori e Gaynes, 1993). Infezioni cliniche importanti causate da *E. faecalis* comprendono la batteriemia, le endocarditi batteriche, le infezioni del tratto urinario e le osteomieliti (Kayser, 2003; Fraimow, 2009). *Enterococcus faecalis* è inoltre al quarto posto fra gli agenti etiologici di infezioni ortopediche associate all’impianto, subito dopo *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, ed è un abile formatore di biofilm (Arciola et al., 2007; Arciola et al., 2008). La diffusione di ceppi di *E. faecalis* resistenti agli aminoglicosidi e alla vancomicina rappresenta un importante problema per il trattamento delle infezioni sostenute da questo microrganismo. I meccanismi

molecolari alla base delle infezioni causate da *E. faecalis* sono stati fin'ora poco investigati, tuttavia è stata dimostrata la capacità di tale batterio di invadere le cellule eucariotiche (Wells et al., 2000; Bertuccini et al., 2002): l'interazione tra le adesine batteriche e particolari recettori cellulari scatena una serie di riarrangiamenti cellulari che portano all'internalizzazione di *E. faecalis* (Hendrickx et al., 2009). L'adesina AS (AS, *Aggregation Substance*) rappresenta un fattore di virulenza coinvolto nell'adesione e nella colonizzazione endoteliale da parte di *E. faecalis* (Kreft et al., 1992): AS contiene 2 motivi Arg-Gly-Asp in grado di interagire con le integrine cellulari (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987). Asc10 è una adesina coinvolta nel processo di internalizzazione di *E. faecalis* all'interno delle cellule epiteliali (Wells et al., 2000; Bertuccini et al., 2002), tuttavia non sembra giocare un ruolo cruciale nell'invasione delle cellule endoteliali (Millán et al., 2013). Queste adesine tuttavia sono coinvolte nella severità delle endocarditi e nella persistenza batterica (Schlievert et al., 2010).

1.6 BIOFILM

La crescita batterica è rappresentata da due distinte modalità di comportamento: la prima è la classica forma planctonica, la seconda è lo stato aggregato o sessile, comunemente chiamato con il termine *biofilm*. Il biofilm batterico è definito come una comunità strutturata di microrganismi, racchiusi in una matrice polimerica prodotta autonomamente ed adesa ad una superficie inerte o vivente (Costerton et al., 1999).

La prima evidenza di biofilm risale al 1684 quando Antonie van Leeuwenhoek descrisse gli "animali" presenti nella placca dentaria (van Leeuwenhoek, 1684). Successivamente, nel 1977, Høiby osservò aggregati di *Pseudomonas aeruginosa* nei polmoni di pazienti affetti da fibrosi cistica. Nel 1978 Costerton evidenziò la presenza di batteri adesi ad una superficie e racchiusi in un "glicocalice" (matrice) (Costerton et al., 1978) e nel 1981 egli impiegò per la prima volta il termine *biofilm* per descrivere questo fenomeno

(McCoy et al., 1981). Successivamente Costerton reinterpretò il concetto parlando di una crescita batterica racchiusa in una matrice (Costerton et al., 1987; Ehrlich and Arciola, 2012). La formazione del biofilm è un processo di sviluppo estremamente regolato dal “*quorum sensing*” che coinvolge segnali cellula-cellula regolando e coordinando la crescita e il comportamento cellulare (O’Toole et al., 2000). Secondo gli Istituti Nazionali di Sanità il biofilm ha serie implicazioni mediche in quanto più dell’80% delle infezioni umane sono sostenute proprio dal biofilm (Lewis, 2001). Inoltre i batteri imbrigliati nella matrice polimerica del biofilm risultano essere resistenti agli antibiotici, ai disinfettanti, alla fagocitosi e ad altri componenti dell’immunità innata e acquisita, rendendo di conseguenza le infezioni ad essi associate difficili da eradicare (Stewart e Costerton, 2001). In base alla specie batterica, all’isolato clinico e alle condizioni ambientali, la matrice polimerica del biofilm può essere costituita da sostanze di varia natura chimica, come l’esopolisaccaride, le proteine, gli acidi teicoici e il DNA extracellulare (eDNA). Una grande varietà di dispositivi medici può essere colonizzata dal biofilm batterico, come cateteri, pacemaker, valvole cardiache artificiali ed impianti ortopedici, inoltre il biofilm può essere associato a varie malattie umane, come le endocarditi, le ferite da ustioni, le otiti e la fibrosi cistica (Costerton et al., 1999).

La stragrande maggioranza delle infezioni associate all’impianto sono di natura stafilococcica e sono caratterizzate dalla formazione del biofilm, infatti nella lista degli agenti eziologici le prime due posizioni sono occupate da *S. aureus* e *S. epidermidis*, seguiti da varie specie di stafilococchi coagulasi-negativi tra cui *S. lugdunensis*. Lo sviluppo del biofilm stafilococcico è un processo multifattoriale e multifasico che prevede quattro passaggi fondamentali: l’attacco, l’aggregazione cellulare, la maturazione e la diffusione (Figura 6) (Arciola et al., 2012a).

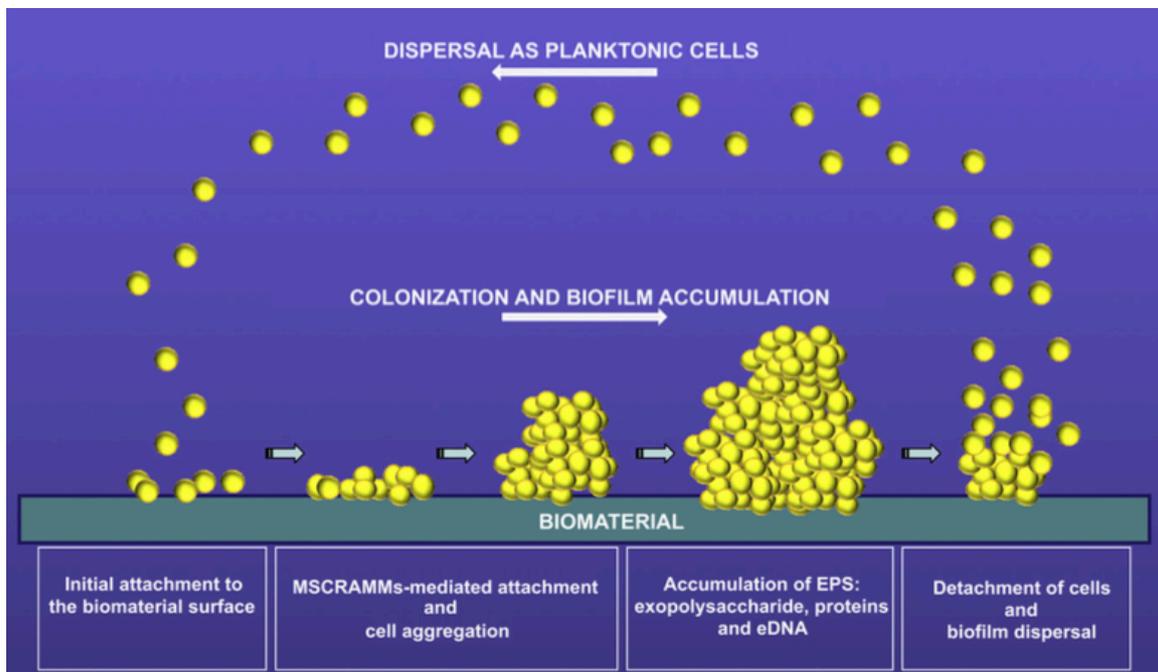


Figura 6: Fasi di formazione del biofilm stafilococcico (Figura modificata da Arciola et al., 2012a).

L'iniziale adesione al tessuto ospite o all'impianto protesico è mediata da interazioni non specifiche ed è guidata da differenti forze di natura idrofobica, elettrostatica e di Lifshitz-Van der Waals. In questa fase i batteri sono assorbiti passivamente sulla superficie del materiale (Legeay et al., 2006). L'adesione iniziale è mediata anche da proteine specifiche, le autolisine: queste proteine sono associate alla superficie batterica attraverso interazioni ioniche o idrofobiche ed hanno una duplice funzione: enzimatica (in quanto fanno parte delle peptidoglicano idrolasi) ed adesiva (Heilmann et al., 1997). L'autolisina/adesina AtlE è una proteina di 148 kDa e media l'adesione di *S. epidermidis* al polistirene. *S. aureus* è caratterizzato dall'autolisina/adesina AtlA, una proteina di 137 kDa con una elevata omologia ad AtlE, che media l'attacco alle superfici di plastica promuovendo il rilascio di DNA da parte delle cellule batteriche (Foster, 1995; Houston et al., 2011); in *S. aureus* l'adesione alle superficie condizionate

dalle proteine plasmatiche dell'ospite è favorita dal clumping factor A (ClfA) e dalle proteine che legano la fibronectina (FnBPs) (Vaudaux et al., 1995). La fase di accumulo e aggregazione in strati batterici multipli è un processo attivo mediato dalle MSCRAMMs e dalla adesione intercellulare (Patti et al., 1994; Speciale et al., 2009). Durante questa fase si osserva una progressiva colonizzazione della superficie da parte del biofilm. La successiva fase di maturazione è caratterizzata dall'aggregazione intercellulare e dalla crescita del biofilm. Responsabile dell'aggregazione sono l'esopolisaccaride PIA (*Polysaccharide Intercellular Adhesin*) (Heilmann et al., 1996) la cui espressione è mediata dai geni *icaADBC* e varie proteine di superficie, come Bap (Cucarella et al., 2001), SasG (Geoghegan et al., 2010b), SasC (Schroeder et al., 2009), SpA (Merino et al., 2009), FnBPs (O'Neill et al., 2008; Geoghegan et al., 2013) per *S. aureus*, Aap (Rohde et al., 2005; Banner et al., 2007) e SesC per *S. epidermidis* (Shahrooei et al., 2009).

Nella maggior parte degli stafilococchi la principale molecola responsabile dell'aggregazione intercellulare è l'esopolisaccaride PIA la cui sintesi è mediata dal locus di adesione intercellulare (*icaADCB*). PIA è costituito da residui di *N*-acetilglucosammina uniti da legami β -1-6, parzialmente deacetilati che insieme ad altri polimeri come l'acido teicoico e le proteine, costituiscono la matrice del biofilm stafilococcico (Figura 7) (Otto, 2008).

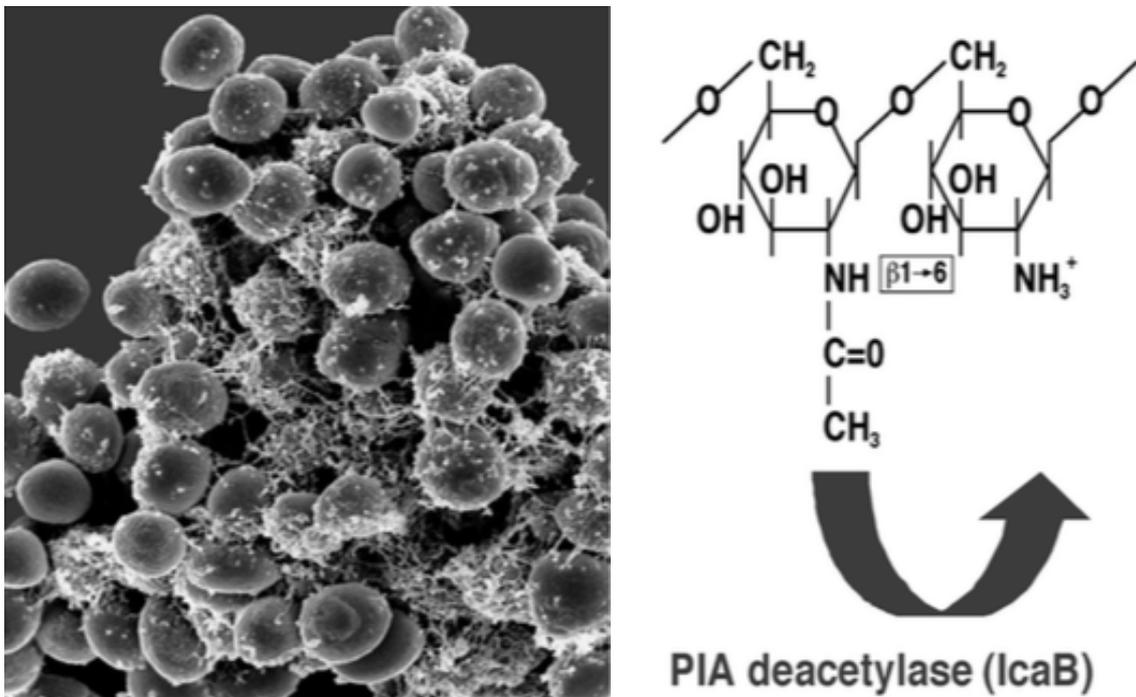


Figura 7: Esopolisaccaride PIA. A: rappresentazione al microscopio elettronico; B: rappresentazione biochimica (Figura modificata da Otto, 2008).

La deacetilazione dei residui di *N*-acetilglucosammina ha una grande importanza biologica, in quanto è responsabile dell'introduzione di una carica positiva nella molecola di per sé neutra liberando quindi i gruppi amminici (Vuong et al, 2004a). Essendo la superficie batterica carica negativamente, si pensa che PIA agisca come una sorta di cemento che lega le cellule attraverso interazioni di tipo elettrostatico

Il locus *ica* è stato scoperto inizialmente in *S. epidermidis* (Heilmann et al., 1996), successivamente è stato osservato anche in *S. aureus* ed in altre specie stafilococciche. L'operone *icaADCB* è costituito da quattro "open reading frames", *icaA*, *icaD*, *icaB* ed *icaC* (Rohde et al., 2006). Un quinto gene, *icaR*, trascritto in maniera divergente e localizzato a monte del codone di inizio di *icaA*, è responsabile della trascrizione di *icaADBC* (Figura 8).

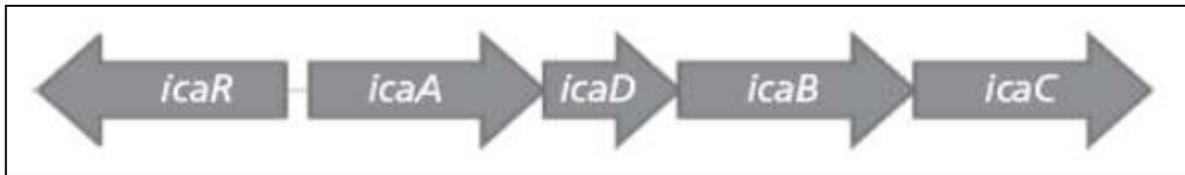


Figura 8: Rappresentazione dell'operone *icaADBC* in *S. epidermidis* (O'Gara e Humpreys, 2001).

icaD è localizzato tra *icaA* ed *icaB*, sovrapponendosi ad entrambi i geni. Durante la sintesi di PIA, IcaA è responsabile dell'attività *N*-acetilglucosaminotransferasica e necessita della presenza di *icaD* per espletare la sua funzione (Gerke et al., 1998). IcaB è una deacetilasi responsabile della deacetilazione della poli-*N*-acetilglucosammina (Vuong et al., 2004b). IcaC è una proteina transmembrana coinvolta nell'esternalizzazione, elongazione e traslocazione a livello della superficie cellulare del polisaccaride in crescita ed inoltre è necessaria per la produzione della molecola PIA (Rohde et al, 2006). È stato dimostrato che i geni del locus *ica* sono o tutti congiuntamente presenti o tutti assenti e che fenomeni di variazione di fase nella produzione del biofilm non sono attribuibili a delezione di singoli geni (Arciola et. al., 2004; Arciola et. al, 2005e).

In *S. lugdunensis*, nonostante la presenza di geni ortologhi a *icaADBC*, PIA non rappresenta il principale componente della matrice del biofilm, che piuttosto risulta essere costituita da proteine (Ravaioli et al., 2012).

Il biofilm maturo è caratterizzato da una specifica struttura tridimensionale che consiste di "torri" o "funghi". All'interno di ciascuna torre scorrono canali pieni di fluidi che hanno il ruolo di portare i nutrienti alle cellule presenti negli strati più profondi del biofilm. Il finale distacco del biofilm è cruciale per la disseminazione batterica e conseguente colonizzazione di altri siti. Molti sono i fattori che contribuiscono al

distacco del biofilm tra cui le forze meccaniche, la cessazione della produzione di PIA ed alcuni fattori in senso stretto come gli enzimi che distruggono la matrice (Otto, 2008).

È stato dimostrato che PIA non è sempre necessario per la formazione del biofilm, infatti la matrice extracellulare del biofilm può essere prodotta anche attraverso un processo PIA-indipendente (O' Gara, 2007) mediato da varie proteine adesive (Figura 9) (Arciola et al., 2012a).

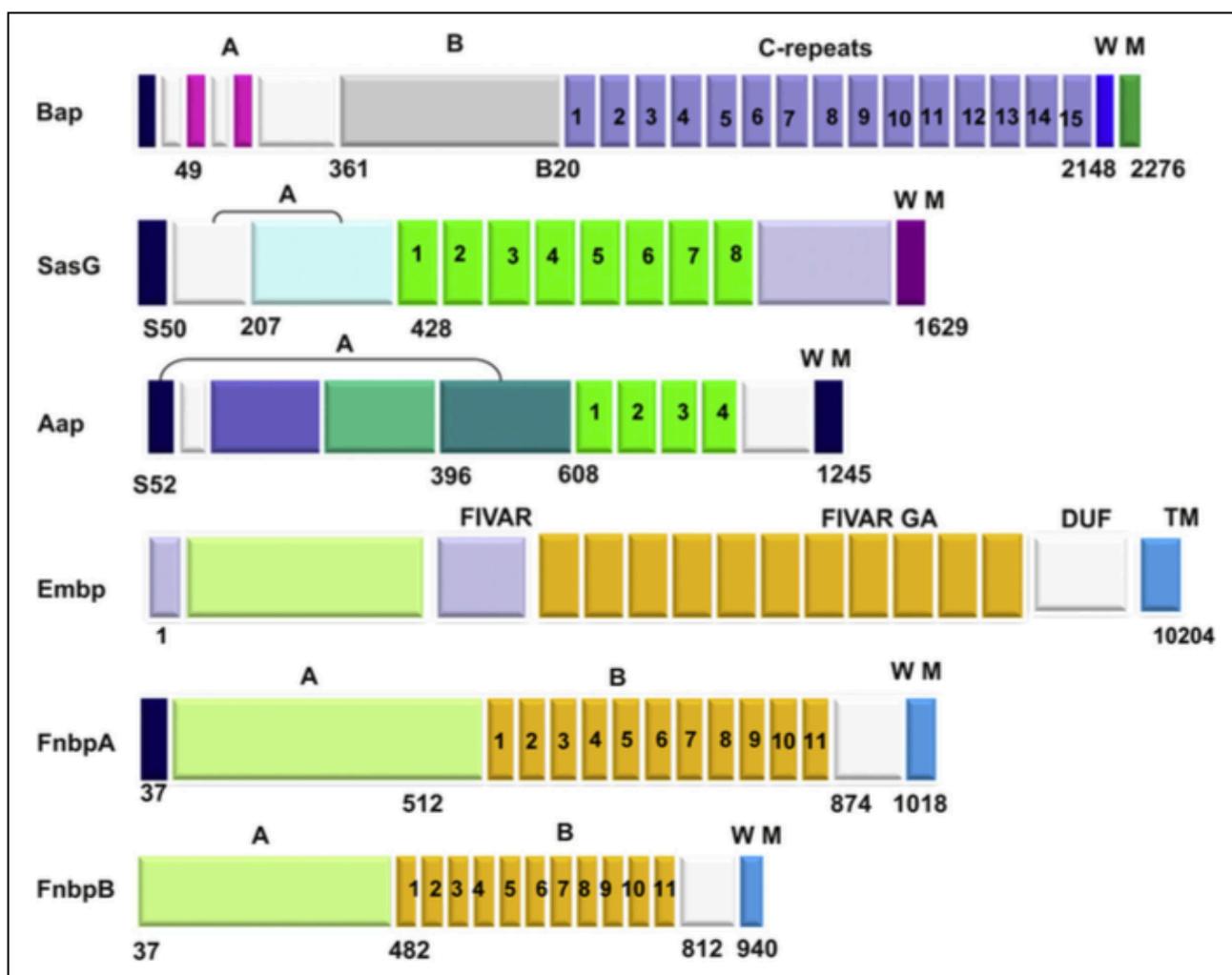


Figura 9: Proteine stafilococciche coinvolte nella formazione del biofilm (Arciola et al., 2012a).

Questo meccanismo alternativo di sintesi del biofilm si basa sulla capacità di *S. aureus* di esprimere una grande varietà di proteine di adesione che consentono alla cellule di aderire e colonizzare differenti superfici. Queste proteine, la maggior parte delle quali sono ancorate alla parete batterica di *S. aureus*, tengono insieme le cellule nel biofilm, probabilmente interagendo con altre proteine di superficie delle cellule vicine. Bap (Biofilm-Associated Protein) è una proteina di 2276 amminoacidi costituita da una sequenza segnale *N*-terminale, formata da due domini A e B la cui funzione è ancora sconosciuta, dal dominio C composto da 16 ripetizioni di 86 amminoacidi ciascuna contenente il motivo LPXTG e da una regione transmembrana (WM) (Cucarella et al., 2001). Il gene *bap* è stato osservato nel genoma di vari stafilococchi coagulasi-negativi tra cui *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus* (Tormo et al., 2005). Per quanto riguarda *S. aureus*, il gene *bap* è stato trovato solo nei ceppi isolati da mastite bovina e in nessun isolato associato ad infezioni umane. In uno studio condotto nel 2009 in tre ospedali in Brasile il gene *bap* è stato riscontrato in soli 10 stafilococchi coagulasi-negativi isolati da infezioni umane nosocomiali (Potter et al., 2009), perciò il ruolo di Bap nelle infezioni stafilococciche umane sembra essere limitato agli stafilococchi coagulasi-negativi. La proteina di superficie SasG è in grado di promuovere la formazione di biofilm in *S. aureus*. Essa è costituita da un dominio *N*-terminale A e da domini B ripetuti. SasG esplica la sua funzione durante la fase di aggregazione quando, in presenza di concentrazioni fisiologiche di Zn^{2+} , la dimerizzazione dei domini B esposti determina le interazioni cellula-cellula (Geoghegan et al., 2010b). Recentemente in uno studio condotto su isolati di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA) è stato osservato che, in presenza di glucosio, anche le proteine che legano la fibronectina, FnBPA e FnBPB, sono associate alla formazione del biofilm (O'Neill et al., 2008). SasC è implicata nella patogenesi infettiva di *S. aureus* durante la fase iniziale di colonizzazione (Schroeder et al., 2009). Aap è una proteina di 220 kDa associata all'accumulo del biofilm in *S. epidermidis*; la proteina, per poter partecipare alla formazione del biofilm, deve subire un taglio proteolitico che ne determina una

dimensione di 140 kDa (Rohde et al., 2005). Aap contiene una regione B ripetuta i cui elementi ripetuti, chiamati domini G5, sono in numero variabile tra 5 e 17. L'adesione intercellulare deriva dall'interazione tra diverse molecole di Aap (Conrady et al., 2008). Recentemente è stato descritto in *S. epidermidis* un ulteriore meccanismo di formazione del biofilm PIA-indipendente che coinvolge la proteina Embp. Embp, una proteina di superficie di 1MDa in grado di legare la fibronectina (Christner et al., 2010), riveste un ruolo rilevante nella patogenesi delle infezioni protesiche (Rohde et al., 2007).

La matrice polimerica del biofilm è ricca anche di DNA extracellulare (eDNA) che prende parte sia alla fase iniziale di adesione che nella successiva aggregazione intercellulare. Il eDNA deriva dalla lisi delle cellule batteriche ed è necessario per lo sviluppo del biofilm (Houston et al., 2011; Montanaro et al., 2011c).

Nel genere stafilococcico il meccanismo di “*quorum sensing*” basato sul gene *agr* (Accessory Gene regulator) controlla l'espressione dei fattori di virulenza e la formazione del biofilm attraverso la comunicazione tra cellule batteriche. Questo sistema si basa su un modulo a due compartimenti, chiamato *agr* locus, che in base alla densità batterica e attraverso la secrezione di una piccola molecola peptidica auto-inducente (AIP), determina la risposta della popolazione batterica quando viene raggiunta una densità cellulare critica. Questi auto-induttori infatti, se accumulati a certi livelli soglia, attivano il sistema inducendo la trascrizione di geni bersaglio, tra cui i fattori di virulenza (Janzon et al., 1989). Il locus *agr* consta di 2 operoni rispettivamente sotto il controllo del promotore P2 e P3. L'operone P2 è costituito da 4 geni *agrBDCA*, che nel complesso fungono da sensore, mentre l'operone P3, trascritto nella direzione opposta, codifica per una molecola effettrice del sistema *agr* (RNAIII), che contiene il gene *hld* responsabile della produzione della δ -tossina. Quando la densità batterica supera un certo valore soglia tali geni agiscono a livello del promotore P3 favorendo da

una parte l'espressione dei geni che codificano per le proteine di secrezione e dall'altra la repressione dei geni che codificano per le proteine di superficie (Feng et al., 2008).

1.7 FAGOCITOSI

Il sistema immunitario innato rappresenta la prima, rapida linea di difesa contro le aggressioni, infatti questi meccanismi di difesa aspecifici sono in grado di limitare la diffusione di malattie infettive, riconoscendo ed eliminando i patogeni (Fournier and Philpott, 2005). I fagociti professionali, come i neutrofili, i macrofagi e le cellule dendritiche, sono le prime cellule dell'immunità innata ad essere reclutate nel sito di infezione in quanto capaci di eliminare i microrganismi direttamente attraverso un'efficiente fagocitosi o indirettamente mediante la produzione ed il rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie. L'immunità innata stimola quindi la risposta immunitaria specifica, più potente e mirata per ciascun patogeno. Le cellule dell'immunità innata sono dotate di vari recettori, chiamati PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Fournier and Philpott, 2005; Pietrocola et al., 2011). Una fagocitosi efficiente prevede la chemotassi, l'adesione cellulare al microrganismo, l'ingestione, l'uccisione e la digestione (Verhoef, 1991). Se questo processo è compromesso, vi è un elevato rischio che il patogeno persista causando, di conseguenza, lo sviluppo dell'infezione (Zimmerli et al., 1991).

La formazione del biofilm batterico sulla superficie degli impianti rappresenta una strategia straordinaria che protegge il patogeno dalle terapie antibiotiche e dai meccanismi di difesa messi in atto dall'ospite (Costerton et al., 2005). Vari studi hanno infatti dimostrato che il principale ruolo della matrice extracellulare del biofilm di *S. epidermidis* è quello di prevenire la fagocitosi operata dai fagociti professionali (Noble et al., 1986; Rodgers et al., 1994). Recentemente è stato osservato che il biofilm di *S. epidermidis* impedisce la fagocitosi da parte dei neutrofili inattivando la via del

complemento (Kristian et al., 2008). La superficie di un impianto risulta quindi essere completamente rivestita dai batteri e il biofilm potrebbe quindi spiegare l'infezione persistente (Costerton et al., 2005).

Alcuni studi hanno dimostrato che in presenza di un biomateriale le cellule immunitarie perdono la loro capacità di uccidere i batteri. I leucociti infatti possono penetrare nel biofilm, ma essi risultano incapaci di fagocitare ed eliminare i batteri (Arciola et al., 2010; Johnson et al., 1986). In presenza del biofilm di *S. epidermids* l'attività battericida dei neutrofilo risulta essere indebolita e la produzione di superossido ridotta (Myrvik et al., 1989; Shanbhag et al., 1992), mentre *S. aureus* fagocitato sopprime la produzione di superossido all'interno dei macrofagi (Leid et al., 2002; Watanabe et al., 2007).

I macrofagi sono tra le prime cellule dell'immunità innata a raggiungere il sito di infezione dove rimangono per parecchie settimane per orchestrare il processo infiammatorio (Anderson, 2004). Durante l'infezione i macrofagi riconoscono i batteri, li ingeriscono e quindi attivano una serie di attività cellulari specifiche, come la proliferazione, la secrezione di citochine e di specie reattive dell'ossigeno al fine di uccidere i patogeni fagocitati e di reclutare le cellule della risposta immunitaria acquisita (Aderem e Underhill, 1999; Underhill e Ozinsky, 2002; Stuart e Ezekowitz, 2005). Molti studi hanno dimostrato che *S. aureus* può sopravvivere alla fagocitosi operata dai macrofagi; Kubica ed i suoi collaboratori hanno osservato che in seguito alla fagocitosi, *S. aureus* rimane nei vacuoli dei macrofagi per 3-4 giorni prima di migrare nel citoplasma determinando la lisi della cellula ospite. Tuttavia prima che avvenga la lisi dei macrofagi, queste cellule non mostrano alcun segno di apoptosi o necrosi e risultano funzionali. La tossina α di *S. aureus* sembra essere fondamentale per la sopravvivenza dei batteri nei macrofagi. È chiaro che *S. aureus* approfitta dei macrofagi per diffondere e propagare l'infezione (Kubica et al., 2008).

I neutrofilo, noti anche con il nome di leucociti polimorfonucleati (PMN), fanno parte dell'immunità innata e svolgono un ruolo fondamentale nella difesa contro i patogeni. Essi, infatti, una volta reclutati nel sito di infezione attraverso la chemiotassi, riconoscono e fagocitano i batteri; la fagocitosi batterica è favorita dall'opsonizzazione dei batteri con le proteine sieriche dell'ospite, come gli anticorpi e il complemento. In seguito alla fagocitosi, i batteri sono confinati nel fagosoma dei neutrofilo. Il fagosoma è un compartimento isolato dei PMN sede di varie attività antimicrobiche. Il citoplasma dei PMN è ricco di granuli. I granuli primari o azzurrofilo contengono la mieloperossidasi (MPO), vari enzimi proteolitici, come le catepsine, la proteinasi-3 e l'elastasi, defensine antimicrobiche e proteine che aumentano la permeabilità. I granuli primari si pensa che derivino dai lisosomi. La mieloperossidasi è un enzima che, una volta rilasciato nel fagosoma, contribuisce ad incrementare la produzione di ROS. I granuli secondari o specifici, contengono invece importanti proteine di membrana come la lattoferrina, la collagenasi, le citochine, le opsonine, le proteine dell'adesione e della matrice extracellulare. In seguito alla fagocitosi batterica, i neutrofilo mettono a segno una serie di strategie ossigeno-dipendenti ed ossigeno-indipendenti, per distruggere i patogeni (Figura 10A). La fagocitosi batterica determina sia la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come i radicali superossido e il perossido d'idrogeno sia la fusione dei granuli citoplasmatici con il fagosoma contenente i batteri. La fusione dei granuli dei PMN con il fagosoma contribuisce alla maturazione del fagolisosoma modificando la composizione del lume del fagolisosoma e della membrana di superficie che si arricchisce di vari recettori e proteine come il complesso della NADPH ossidasi coinvolto nella generazione dei ROS (Arciola et al., 2012b). E' stato dimostrato che i neutrofilo reclutati nel sito dell'impianto infettato sono incapaci di uccidere efficientemente gli stafilococchi (Zimmerli et al., 1982) ed inoltre mostrano una degranolazione parziale ed una ridotta produzione di ROS. Pertanto i neutrofilo, funzionalmente compromessi, facilitano l'adesione batterica alla superficie dell'impianto e la successiva formazione del biofilm.

I batteri esposti, all'interno del fagosoma, ai prodotti antimicrobici e allo stress ossidativo e respiratorio, hanno sviluppato dei meccanismi per evadere le risposte immunitarie dell'ospite (Cohn e Hirsch, 1960). *S. aureus*, ad esempio, possiede dei fattori che impediscono il suo riconoscimento e il successivo legame da parte dei neutrofili, come la produzione della capsula polisaccaridica e della matrice extracellulare del biofilm (O'Riordan e Lee, 2004; Vuong et al., 2004a). Inoltre SpA, legando la regione Fc delle IgG, rappresenta un'ottima maschera consentendo l'interferenza con l'opsonizzazione e la conseguente fagocitosi batterica (Forsgren e Nordström, 1974; Langone, 1982). Molte proteine di *S. aureus* sono in grado di inibire la chemotassi e la cascata del complemento (Langone, 1982; Rooijackers et al., 2005); inoltre *S. aureus* è provvisto di molti fattori che lo proteggono dalle attività antimicrobiche del fagosoma. La catalasi, la superossido dismutasi e la stafiloxantina proteggono *S. aureus* dal killing mediato dalle specie reattive dell'ossigeno (Liu et al., 2005; DeLeo et al., 2009). Mentre il rilascio di proteasi non specifiche e del sistema di regolazione genica in grado di rilevare la presenza di peptidi antimicrobici dei neutrofili, forniscono una protezione contro il killing ossigeno-indipendente (Sieprawska-Lupa et al., 2004; Li et al., 2007). *S. aureus*, oltre alle summenzionate strategie difensive "passive", secerne anche molte tossine in grado di danneggiare le cellule dell'ospite, tra cui i neutrofili (Joubert et al., 2007) (Figura 10B). Infine *S. aureus* possiede vari superantigeni che stimolano eccessivamente il sistema immunitario dell'ospite provocando, di conseguenza, risposte sgradite (Zimmerli et al., 1982).

Recentemente è stata proposta un'ulteriore strategia antimicrobica dei neutrofili che consiste nella formazione delle NET (*Neutrophil Extracellular Traps*). Le NET sono composte da cromatina decondensata arricchita da proteine citoplasmatiche come l'elastasi, la mieloperossidasi, la catepsina G, la lattoferrina, la gelatinasi, LL-37, la triptasi, gli istoni e il lisozima (Arciola, 2010). È importante sottolineare che la lattoferrina non solo possiede un'attività battericida, ma è anche capace di prevenire la formazione del biofilm (Meyle et al., 2012). Si pensa che le NET abbiano due ruoli

importanti nell'ambito della difesa contro i batteri: queste trappole sono in grado di limitare sia la diffusione microbica sia i danni collaterali causati dal contenuto dei granuli (Figura 10C).

Non è chiaro come i neutrofili decidano quale strategia antimicrobica mettere in atto; una possibile ipotesi si basa sulla tempistica di questi eventi: prima la fagocitosi, poi la successiva degranulazione e quindi la formazione delle NET.

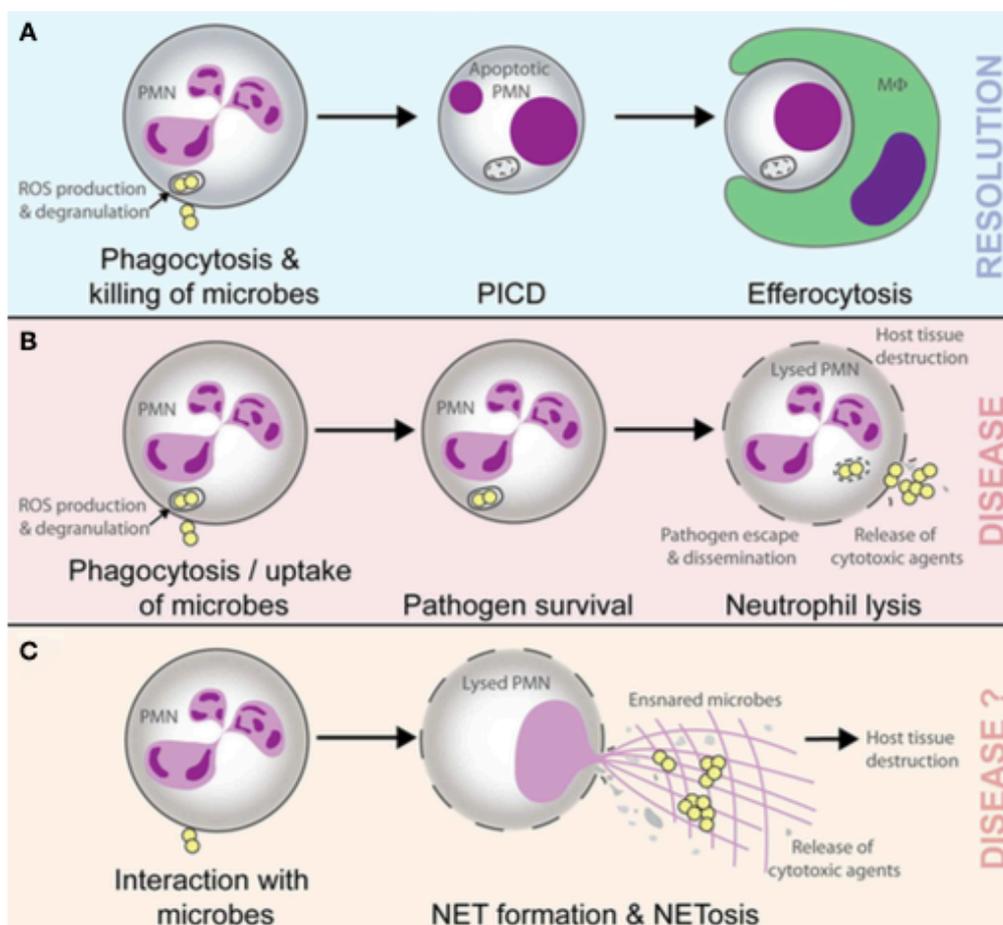


Figura 10: Modello di interazione tra PMN e batteri (Lu et al., 2012).

È stato dimostrato che il DNA è rilasciato dai PMN nel sito dell'infezione in presenza di biofilm stafilococcico (Meyle et al., 2012). Si ritiene inoltre che il DNA sia cruciale per l'integrità del biofilm, tuttavia rimane ancora da chiarire il suo ruolo.

Durante un'infezione microbica, la fagocitosi batterica operata dai neutrofilici agisce come preludio per la successiva apoptosi dei PMN; successivamente i macrofagi eliminano i neutrofilici apoptotici. In questo modo l'apoptosi dei PMN indotta dalla fagocitosi e la successiva *clearance* dei macrofagi favoriscono la risoluzione dell'inflammatione associata all'infezione, mentre il fallimento dell'apoptosi dei PMN induce il rilascio dei propri fattori proteolitici e citotossici promuovendo la locale distruzione infiammatoria tissutale. Nonostante l'intervento dell'immunità innata nel sito dell'infezione associata all'impianto protesico, la persistenza del biofilm e della distruzione infiammatoria tissutale determinano l'osteolisi. L'osteolisi è strettamente associata alla incapacità dei PMN di compiere una efficiente fagocitosi, un processo noto con il nome di "fagocitosi frustrata". È chiaro pertanto che la fagocitosi ha un ruolo ambiguo: da una parte essa rappresenta una strategia antibatterica e allo stesso tempo è responsabile dell'osteolisi (Arciola, 2010).

2. MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE CELLULARI MG-63

Le colture cellulari di osteoblasti sono state allestite partendo dalla linea cellulare di osteosarcoma umano (MG-63) acquistata precedentemente dalla ATCC (Rockville, MD, USA) e conservata in azoto liquido. Lo scongelamento è stato effettuato seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice. La *vial* crioresistente contenente 1 ml di sospensione cellulare è stata dapprima scongelata in acqua distillata a 37°C, in seguito è stato aggiunto il terreno completo costituito da MEM "Minimum Essential Medium" supplementato con il 10% di FBS "Fetal Bovine Serum" inattivato al calore, con la L-glutamina (2 mM) e con l'1% di una soluzione di penicillina-streptomina (10000 U/ml; 10 mg/ml streptomina). In seguito alla centrifugata è stato eliminato il sovrnatante e quindi il pellet è stato risospeso con il terreno completo. Tale sospensione cellulare è stata seminata in una fiasca T25, successivamente posta in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5%. Dopo 2 giorni le cellule hanno mostrato una confluenza di circa il 70-80%, in seguito sono state staccate mediante l'utilizzo di tripsina-EDTA (0.5% Tripsina; 5.3 mM EDTA 4Na) diluiti in D-PBS "Dulbecco's Phosphate Buffered Saline" sterile 1X (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na₂HPO₄-7H₂O). Il passaggio 1:4 delle cellule è stato eseguito due volte a settimana, mentre il terreno è stato cambiato ogni due giorni.

2.2 COLORAZIONE ROSSO DI ALIZARINA

La colorazione basata sul rosso di Alizarina è un metodo colorimetrico usato per valutare la presenza di depositi di Ca²⁺. Il rosso di alizarina è un colorante antrachinonico in grado di formare complessi con il Ca²⁺. In seguito alla colorazione, i depositi di Ca²⁺ appaiono di colore rosso-arancio. Le cellule MG-63 sono state seminate

in delle opportune fiasche il cui fondo è costituito da un vetrino da microscopia (Flaskette Chamber, Nunc) ad una densità di 1×10^4 cellule/cm². Il terreno completo (MEM supplementato con il 10% FBS, L-glutammina 2mM e 1% di Penicillina-Streptomicina) è stato cambiato ogni due giorni. Le cellule sono state incubate in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5%. La colorazione rosso di Alizarina è stata effettuata dopo 23 giorni dalla semina. Il monostrato cellulare è stato dapprima lavato con D-PBS e quindi fissato in formaldeide 3,7% per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate con un eccesso di H₂O bidistillata prima di aggiungere la soluzione Rosso di Alizarina 2%. I vetrini sono stati incubati a temperatura ambiente per circa 1 ora. Sono stati effettuati 4 lavaggi con H₂O bidistillata in modo da eliminare la soluzione di alizarina in eccesso. I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico.

2.3- SCREENING DI INTERNALIZZAZIONE DI ISOLATI CLINICI

Il saggio di internalizzazione ha consentito di analizzare la capacità di isolati clinici, appartenenti alle specie batteriche maggiormente associate ad infezioni ortopediche, di invadere le cellule osteblastoidi MG-63.

S. epidermidis* e *S. lugdunensis

Ceppi batterici

Nello studio sono stati utilizzati 42 isolati clinici di *S. epidermidis*, 9 di *S. lugdunensis* e 1 di *S. aureus* provenienti da infezioni ortopediche e 1 isolato *S. aureus* di riferimento ATCC25923. Tutti gli isolati clinici provengono da pazienti sottoposti ad interventi chirurgici presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli e fanno parte di una numerosa collezione

della Biobanca del Laboratorio di Patologia delle Infezioni associate all'Impianto dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, diretto dalla Prof.ssa Carla Renata Arciola. Tutti i ceppi sono stati successivamente sottoposti a ribotipizzazione automatica mediante il RiboPrinter® Microbial Characterization System (DuPont Qualicon, Willmington, DE, USA). La ribotipizzazione è una tecnica di tipizzazione genotipica che si basa sull'analisi dei frammenti di restrizione dei geni codificanti gli RNA ribosomiali. Il RiboPrinter® esegue l'analisi di ribotipizzazione in maniera quasi completamente automatizzata, la preparazione del campione, infatti, è la sola fase che ha luogo al di fuori dell'unità di caratterizzazione del RiboPrinter. Tutti gli isolati sono stati ribotipizzati, identificati tassonomicamente e classificati in ribogruppi dal RiboPrinter® in base alla similarità dei patterns dei ribotipi. I patterns generati dal RiboPrinter® si basano sulla digestione enzimatica mediante EcoRI e sull'ibridizzazione dei risultanti frammenti di restrizione con una sonda marcata. Tutti i profili degli isolati sono stati analizzati dal programma BioNumerics version 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) (Campoccia et al., 2009c; Testoni et al., 2011; Ravaioli et al., 2012). Per gli isolati clinici di *S. epidermidis* la resistenza agli antibiotici aminoglicosidici è stata testata sia fenotipicamente che genotipicamente: dei 42 isolati clinici di *S. epidermidis* usati nello studio, 22 sono sensibili alla gentamicina e 20 sono resistenti (Campoccia et al., 2009d).

Gli isolati di *S. lugdunensis* impiegati nello studio sono sensibili alla gentamicina (Ravaioli et al., 2012) e tutti, eccetto l'isolato cra1750 usato come controllo negativo, provengono da infezioni ortopediche associate all'impianto. Gli isolati cra1871, cra1363, cra2847 e cra2653, appartengono al ribogruppo cra-62-S-1 che include anche altri isolati clinici provenienti da differenti tipi di infezioni. Il ribogruppo cra-62-S-1 è un clone altamente epidemico.

L'isolato clinico *S. aureus* cra1199, data la sua capacità di invadere le cellule MG-63 e la sua sensibilità alla gentamicina (Testoni et al., 2011), è stato usato come controllo positivo. Nello studio è stato usato anche un altro isolato di *S. aureus*, il ceppo di

riferimento ATCC25923. L'isolato *S. lugdunensis* cra1750 è stato usato come controllo negativo, sebbene esso mostri un livello di internalizzazione non nullo, ma davvero basso.

Le tabelle 2 e 3 mostrano le informazioni dettagliate degli isolati impiegati nella sperimentazione.

Ceppi Batterici		
Nome	N°	Origine
Isolati di controllo (2)		
<i>S. lugdunensis</i> cra1750 (Ctrl-)	1	no MDs
<i>S. aureus</i> cra1199 (Ctrl+)	1	FE
Reference strain (1)		
<i>S. aureus</i> ATCC25923	1	Ceppo clinico isolato nel 1945
<i>S. epidermidis</i>: isolati clinici ortopedici aminoglicosidi-sensibili (22)		
	11	H
	7	K
	1	FI
	1	FE
	1	Osteomielite no MDs
	1	Infezione post-chirurgica
<i>S. epidermidis</i>: isolati clinici ortopedici aminoglicosidi-resistenti (20)		
	5	H
	6	Infezione post-chirurgica
	4	K
	3	FI
	2	Infezione associata a tumori
<i>S. lugdunensis</i> (8)		
	3	FI
	2	K
	2	H
	1	FE

Tabella 2: Lista degli isolati batterici impiegati nella sperimentazione. Nella tabella è descritta l'origine degli isolati batterici usati (no MDs, infezione non associata a dispositivo medico; H, infezione associata a protesi d'anca; K, infezione associata a protesi di ginocchio; FE, infezione associata a fissatori esterni; FI, infezione associata a fissatori interni).

Specie batterica	Ribogruppo	N°
<i>S. epidermidis</i>	cra-63-S-7	9
	cra-119-S-4	7
	cra-123-S-5	5
	cra-92-S-5	4
	cra-122-S-2	4
	cra-80-S-1	4
	cra-93-S-3	3
	cra-63-S-4	3
	cra-126-S-5	2
	cra-126-S-2	1
<i>S. lugdunensis</i>	cra-62-S-1	4
	cra64-S-8	4
	cra-74-S-5	1
<i>S. aureus</i>	cra-119-S-8	1

Tabella 3: Dati di ribotipizzazione degli isolati impiegati nella sperimentazione.

Allestimento delle colture cellulari MG-63

In ciascuna piastra da 96 pozzetti sono stati testati il controllo positivo ed il controllo in triplicato e 3 isolati clinici, anch'essi in triplicato, in presenza ed in assenza di cellule MG-63. I pozzetti senza cellule MG-63 rappresentano il controllo del background della sopravvivenza batterica in assenza di batteri internalizzati. Lo schema dell'organizzazione della micropiastra è rappresentato in figura 11.

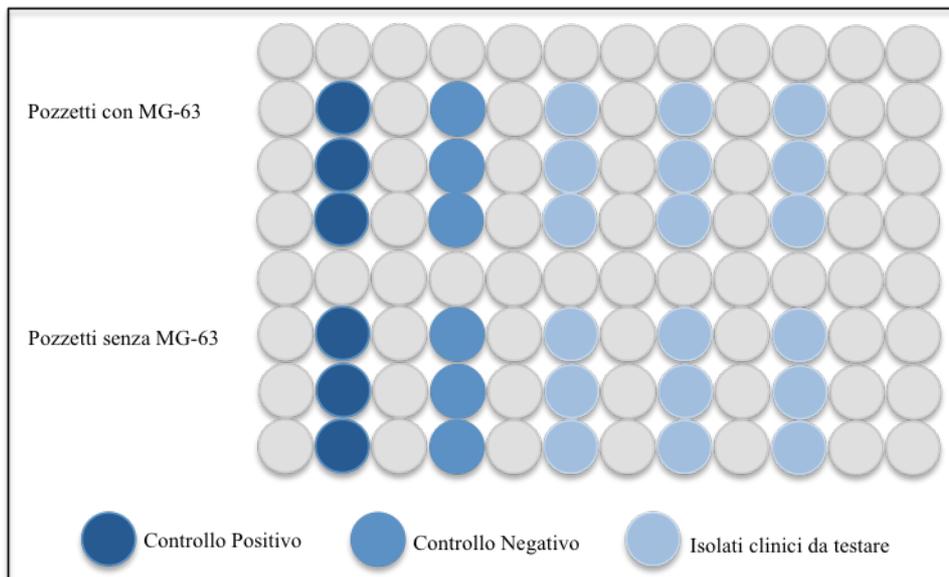


Figura 11: Schema dell'organizzazione della micropiastra da 96 pozzetti.

Le cellule MG-63 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pozzetto (100 μ l) in terreno completo privo di antibiotici (MEM supplementato con il 10% FBS e L-glutammina 2mM). Per il controllo senza cellule, i pozzetti sono stati seminati con 100 μ l di terreno completo privo di antibiotici. La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 24 ore. Dopo 24 ore il numero delle cellule MG-63 in ciascun pozzetto è pari a circa 1×10^4 ; il calcolo del numero di cellule MG-63 per pozzetto dopo 24 ore dalla semina è stato effettuato in 3 esperimenti indipendenti ed il valore calcolato è stato pari a $1.0 \pm 0.8 \times 10^4$ cellule/pozzetto.

Preparazione dell'inoculo batterico

I ceppi batterici stoccati a -80°C sono stati scongelati e piastrati con un'opportuna ansa in TSA (Tryptical Soy Agar), un terreno non selettivo che viene mantenuto in coltura in termostato a 37°C per 24 ore. Per il test di internalizzazione, una colonia cresciuta in

piastra TSA è stata inoculata in TB (Tryptose Broth) ed è stata mantenuta in termostato a 37°C per circa 18 ore. La sospensione batterica è stata centrifugata ed il pellet è stato risospeso nel terreno costituito da MEM supplementato con il 10% FBS e L-glutamina 2mM. La concentrazione batterica è stata stimata con la lettura della densità ottica a 550 nm utilizzando lo spettrofotometro Hewlett Packard G1103A. Per ciascuna specie batterica analizzata è stata studiata la correlazione densità ottica-CFU (Colony Forming Unit) e le equazioni delle rette di regressione sono state usate per l'allestimento dell'inoculo batterico con cui infettare il monostrato di cellule MG-63. Tuttavia al fine di conoscere il valore esatto di M.O.I. con cui è stato condotto il saggio di internalizzazione, ciascun inoculo è stato quantificato. La M.O.I. (Multiplicity Of Infection) è definita come il rapporto tra il numero delle particelle infettanti, nel caso in esame rappresentate dai batteri, rispetto al numero delle cellule infettate. Pertanto a partire da ciascun inoculo sono state allestite 6 diluizioni seriali in NaCl 0.9% e quindi sono state piastrati 100 µl delle diluizioni "4", "5" e "6" su piastre TSA (Figura 12).

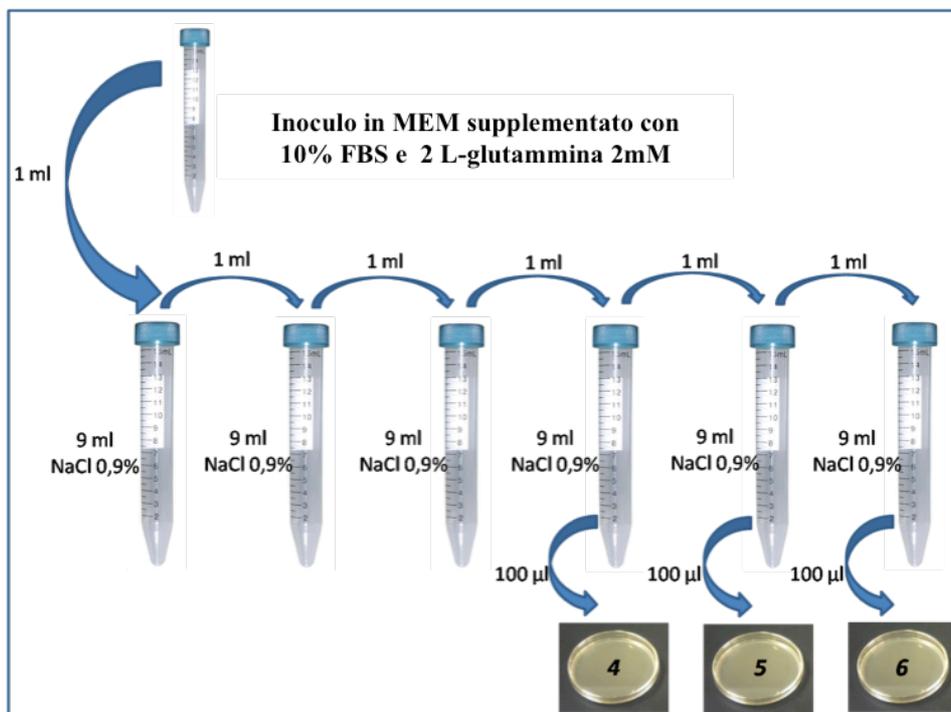


Figura 12: Schema per la quantificazione dell'inoculo con cui si effettua l'infezione.

Saggio di internalizzazione

Il saggio di internalizzazione di isolati clinici di *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* è stato effettuato su piastre da 96 pozzetti secondo lo schema descritto di seguito (Figura 13). Prima di procedere all'infezione, ciascun pozzetto (con e senza cellule MG-63) è stato lavato una volta con 200 µl di D-PBS. Quindi 100 µl di sospensione batterica in terreno completo (MEM supplementato con 10% di FBS e L-glutamina 2mM) sono stati aggiunti in ciascun pozzetto. L'infezione degli isolati di *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* è stata effettuata ad una M.O.I. pari a 500:1, mentre l'infezione dei controlli (*S. lugdunensis* cra1750 e *S. aureus* cra1199) e dell'isolato *S. aureus* di riferimento ATCC25923 è stata effettuata ad una M.O.I. di 100:1.

Nello studio condotto da Khalil (Khalil et al., 2007), l'internalizzazione di isolati di *S. epidermidis* è stata testata utilizzando una M.O.I. pari a 500:1 in quanto è stato

dimostrato che questa M.O.I. consentiva il raggiungimento del plateau, ovvero del livello maggiore di invasione del ceppo di riferimento di *S. epidermidis* NCTC11047 all'interno degli osteoblasti.

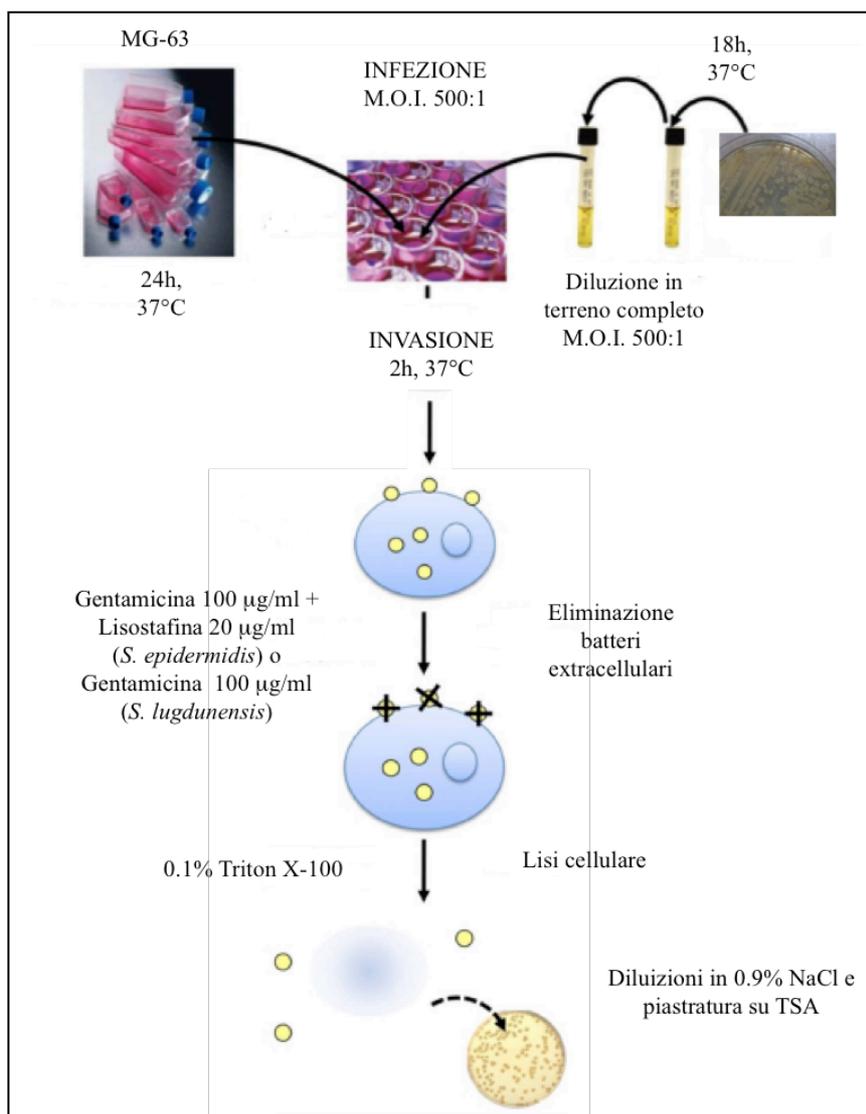


Figura 13: Schema sperimentale del saggio di internalizzazione di isolati clinici di *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* provenienti da infezioni ortopediche in cellule MG-63 (Figura modificata da Valour et al., 2013).

La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 2 ore. In seguito all'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato 4 volte con 200 µl di D-PBS e quindi è stato trattato con 200 µl di terreno completo (MEM supplementato con il 10% di FBS e L-glutamina 2mM) supplementato con 100 µg/ml di gentamicina e 20 µg/ml di lisostafina per gli isolati clinici di *S. epidermidis* e supplementato con 100 µg/ml di gentamicina per gli isolati di *S. lugdunensis* al fine di eliminare i batteri extracellulari. La gentamicina è un antibiotico aminoglicosidico incapace di entrare nelle cellule eucariotiche (Wilson et al., 1982). La lisostafina, un agente antimicrobico incapace anch'esso di entrare nelle cellule eucariotiche, è in grado di eliminare gli organismi extracellulari ed è attivo anche nei confronti dei batteri resistenti agli antibiotici aminoglicosidici (Kumar, 2008; Noore et al., 2013). Pertanto la combinazione dei due agenti dovrebbe essere in grado di eliminare i batteri extracellulari indipendentemente dal loro pannello di resistenza agli antibiotici. La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 2 ore. Al termine dell'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato con 200 µl di D-PBS e quindi trattato con 150 µl di 0.1% di Triton X-100 per 5 minuti a 37°C in modo che avvenga la lisi delle cellule eucariotiche e il conseguente rilascio dei batteri intracellulari. I lisati cellulari del controllo negativo, degli isolati clinici di *S. lugdunensis* e degli isolati clinici di *S. epidermidis* sensibili agli antibiotici aminoglicosidici sono stati direttamente seminati in piastre TSA, mentre per il controllo positivo, per l'isolato di riferimento *S. aureus* ATCC25923 e per gli isolati clinici di *S. epidermidis* resistenti agli antibiotici aminoglicosidici è stato necessario effettuare delle diluizioni seriali in 0.9% di NaCl prima di procedere alla piastratura su TSA. Le piastre sono state poste in termostato a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stata eseguita la conta delle CFU.

Saggio di adesione di isolati clinici di *S. epidermidis* alle cellule MG-63

Nelle prime fasi del lavoro sperimentale è stato osservato che nei ceppi di *S. epidermidis* resistenti agli antibiotici aminoglicosidici il trattamento combinato basato sull'impiego della gentamicina e della lisostafina risultava incapace di eliminare i batteri extracellulari ed inoltre si osservava una differenza considerevole in termini di CFU in presenza ed in assenza di cellule MG-63: in presenza di cellule MG-63 il numero di CFU era notevolmente più alto. Queste differenze potrebbero essere associate ad una maggiore efficienza di internalizzazione nelle cellule MG-63 o, più semplicemente, ad una maggiore adesione dei batteri alla superficie delle cellule MG-63. Pertanto l'adesione degli isolati clinici è stata testata in parallelo in triplicato in presenza ed in assenza di cellule MG-63. In particolare sono stati testati 3 isolati clinici *S. epidermidis* sensibili agli antibiotici aminoglicosidici e 4 isolati resistenti. Il protocollo sperimentale seguito per il saggio di adesione è stato simile a quello descritto in precedenza per il test di internalizzazione, tuttavia il trattamento combinato per eliminare i batteri extracellulari è stato ovviamente evitato. Pertanto in seguito alle 2 ore di incubazione con le sospensioni batteriche, ciascun pozzetto è stato lavato 4 volte con 200 µl di D-PBS e quindi trattato con 150 µl di 0.1% di Triton X-100 per 5 minuti a 37°C. Per quantificare i batteri adesi alla superficie delle cellule MG-63, sono state seminate su TSA le diluizioni seriali dei lisati cellulari in 0.9% NaCl. Le piastre sono state poste in termostato a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stata eseguita la conta delle CFU.

E. faecalis

Ceppi batterici

Nello studio sono stati utilizzati 21 isolati clinici di *E. faecalis*, 1 di *S. lugdunensis* (cra1750) e 1 di *S. aureus* (cra1199) provenienti da infezioni ortopediche post-chirurgiche. Tutti gli isolati clinici provengono da pazienti sottoposti ad interventi chirurgici presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli e fanno parte della numerosa collezione della Biobanca del Laboratorio di Patologia delle Infezioni associate all'Impianto dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, diretto dalla Prof.ssa Carla Renata Arciola. Tutti i ceppi sono stati successivamente sottoposti a ribotipizzazione automatica mediante il RiboPrinter® Microbial Characterization System (DuPont Qualicon, Willmington, DE, USA) e classificati in ribogruppi dal RiboPrinter® in base alla similarità dei patterns dei ribotipi (Arciola et al., 2007). Tutti gli isolati clinici di *E. faecalis* impiegati nello studio sono sensibili alla gentamicina; la sensibilità alla gentamicina è stata eseguita con il metodo di diffusione nell'agar (Kirby-Bauer) secondo le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2008) (Arciola et al., 2007).

L'isolato clinico *S. lugdunensis* cra1750 è stato usato come controllo negativo, mentre l'isolato clinico *S. aureus* cra1199 è stato usato come controllo positivo.

Le tabelle 4 e 5 mostrano le informazioni dettagliate degli isolati impiegati nella sperimentazione.

Ceppi Batterici		
Nome	N°	Origine
Isolati di controllo (2)		
<i>S. lugdunensis</i> cra1750 (Ctrl-)	1	no MDs
<i>S. aureus</i> cra1199 (Ctrl+)	1	FE
<i>E. faecalis</i>: isolati clinici ortopedici (21)		
	7	FI
	6	no MDs
	3	H
	2	FE
	2	Infezione associata a tumori
	1	Infezione post-chirurgica

Tabella 4: Lista degli isolati batterici impiegati nella sperimentazione. Nella tabella è descritta l'origine degli isolati batterici usati (no MDs, infezione non associata a dispositivo medico; H, infezione associata a protesi d'anca; FE, infezione associata a fissatori esterni; FI, infezione associata a fissatori interni).

Specie batterica	Ribogruppo	N°
<i>E. faecalis</i>	cra-115-S-2	5
	cra-115-S-8	4
	cra-116-S-1	3
	cra-116-S-7	3
	cra-115-S-4	2
	cra-118-S-1	2
	cra-118-S-2	2
	<i>S. lugdunensis</i>	cra-74-S-5
<i>S. aureus</i>	cra-119-S-8	1

Tabella 5: Dati di ribotipizzazione degli isolati impiegati nella sperimentazione.

Allestimento delle colture cellulari MG-63

In ciascuna piastra da 96 pozzetti sono stati testati il controllo positivo ed il controllo in triplicato e 3 isolati clinici, anch'essi in triplicato, in presenza ed in assenza di cellule MG-63 (Figura 11). I pozzetti senza cellule MG-63 rappresentano il controllo del background della sopravvivenza batterica in assenza di batteri internalizzati. Le cellule MG-63 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pozzetto (100 μ l) in terreno completo privo di antibiotici (MEM supplementato con il 10% FBS e L-glutammina 2mM). Per il controllo senza cellule, i pozzetti sono stati seminati con 100 μ l di terreno completo privo di antibiotici. La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 24 ore. Dopo 24 ore il numero delle cellule MG-63 in ciascun pozzetto è pari a circa 1×10^4 ; il calcolo del numero di cellule MG-63 per pozzetto dopo 24 ore dalla semina è stato effettuato in 3 esperimenti indipendenti ed il valore calcolato è stato pari a $1.0 \pm 0.8 \times 10^4$ cellule/pozzetto.

Preparazione dell'inoculo batterico

I ceppi batterici stoccati a -80°C sono stati congelati e piastrati con un'opportuna ansa in TSA (Tryptical Soy Agar), un terreno non selettivo che viene mantenuto in coltura in termostato a 37°C per 24 ore. Per il test di internalizzazione, una colonia cresciuta in piastra TSA è stata inoculata in TB (Tryptose Broth) ed è stata mantenuta in termostato a 37°C per circa 18 ore. La sospensione batterica è stata centrifugata ed il pellet è stato risospeso nel terreno costituito da MEM supplementato con il 10% FBS e L-glutammina 2mM. La concentrazione batterica è stata stimata con la lettura della densità ottica a 550 nm utilizzando lo spettrofotometro Hewlett Packard G1103A. Per ciascuna specie batterica analizzata è stata studiata la correlazione densità ottica-CFU (colony formation unit) e le equazioni delle rette di regressione sono state usate per l'allestimento dell'inoculo batterico con cui infettare il monostrato di cellule MG-63. Tuttavia al fine di conoscere il valore esatto di M.O.I. con cui è stato condotto il saggio di internalizzazione, ciascun inoculo è stato quantificato (Figura 12).

Saggio di internalizzazione

Il saggio di internalizzazione di isolati clinici di *E. faecalis* è stato effettuato su piastre da 96 pozzetti secondo lo schema descritto di seguito (Figura 14). Prima di procedere all'infezione, ciascun pozzetto (con e senza cellule MG-63) è stato lavato una volta con 200 μ l di D-PBS. Quindi 100 μ l di sospensione batterica in terreno completo (MEM supplementato con 10% di FBS e L-glutamina 2mM) sono stati aggiunti in ciascun pozzetto. L'infezione degli isolati di *E. faecalis* è stata effettuata ad una M.O.I. pari a 1000:1, mentre l'infezione dei controlli (*S. lugdunensis* cra1750 e *S. aureus* cra1199) è stata effettuata ad una M.O.I. di 100:1.

Nello studio condotto da Millán (Millán et al., 2013), l'internalizzazione di isolati di *E. faecalis* è stata testata utilizzando una M.O.I. pari a 1000:1 in quanto è stato dimostrato che questa M.O.I. consentisse il raggiungimento del livello maggiore di invasione degli isolati clinici di *E. faecalis* all'interno delle cellule endoteliali.

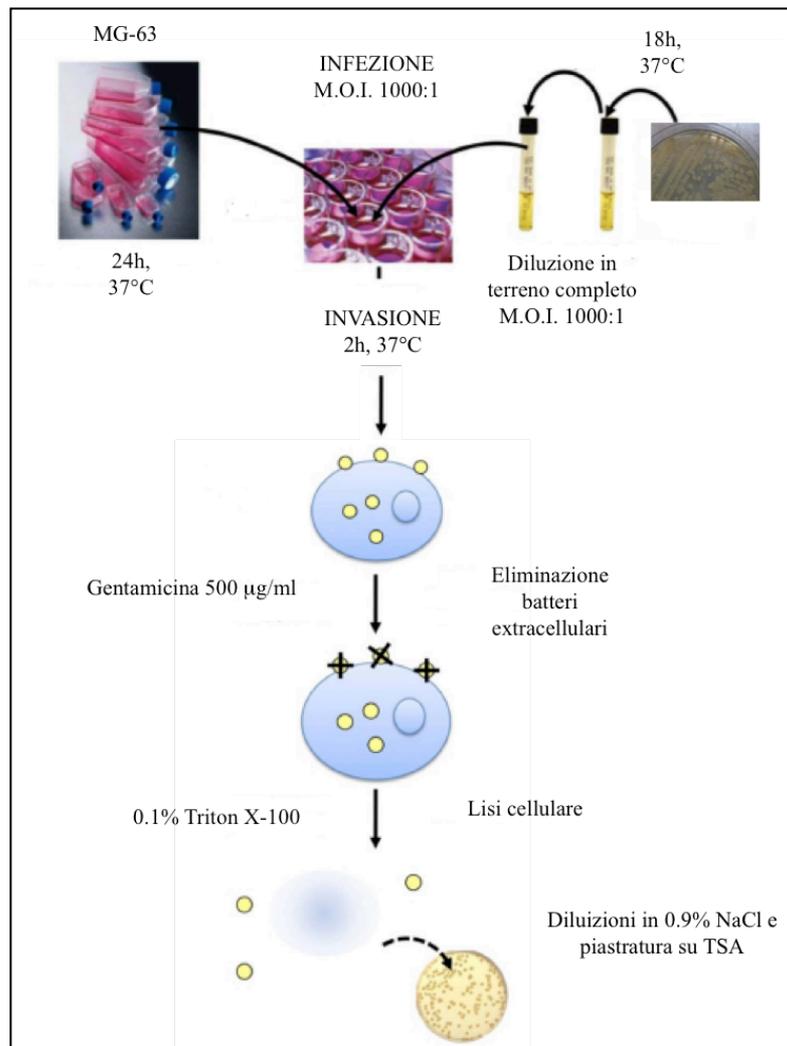


Figura 14: Schema sperimentale del saggio di internalizzazione di isolati clinici di *E. faecalis* provenienti da infezioni ortopediche in cellule MG-63 (Figura modificata da Valour et al., 2013).

La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 2 ore. In seguito all'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato 4 volte con 200 µl di D-PBS e quindi è stato trattato con 200 µl di terreno completo (MEM supplementato con il 10% di FBS e L-glutamina 2mM) supplementato con 500 µg/ml di gentamicina (Millán et al., 2013). La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in

atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 2 ore. Al termine dell'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato con 200 µl di D-PBS e quindi trattato con 150 µl di 0.1% di Triton X-100 per 5 minuti a 37°C in modo che avvenga la lisi delle cellule eucariotiche e il conseguente rilascio dei batteri intracellulari. I lisati cellulari del controllo negativo e degli isolati clinici di *E. faecalis* sono stati direttamente seminati in piastre TSA, mentre per il controllo positivo è stato necessario effettuare delle diluizioni seriali in 0.9% di NaCl prima di procedere alla piastratura su TSA. Le piastre sono state poste in termostato a 37°C per 24 ore, al termine delle quali si esegue la conta delle CFU.

2.4 OTTIMIZZAZIONE DEL SAGGIO DI INTERNALIZZAZIONE DI ISOLATI CLINICI

L'ottimizzazione del saggio di internalizzazione ha consentito di confrontare la capacità di isolati clinici appartenenti a specie batteriche diverse e associati alle infezioni ortopediche di invadere le cellule osteoblastoidi MG-63. Il confronto tra gli isolati oggetto di studio è stato possibile in quanto sono stati considerati i valori di CFU internalizzate per pozzetto a parità di M.O.I. con cui è stata effettuata l'infezione.

Ceppi batterici

Nello studio sono stati utilizzati 7 isolati clinici di *S. epidermidis*, 5 di *S. lugdunensis*, 2 di *E. faecalis* e 1 di *S. aureus* provenienti da infezioni ortopediche e 1 isolato *S. aureus* di riferimento ATCC25923. Gli isolati testati con questo nuovo approccio sperimentale sono stati scelti tra quelli precedentemente analizzati nello screening di internalizzazione (Punto 2.3) sulla base della sensibilità alla gentamicina e all'appartenenza a ribogruppi diversi.

Tutti gli isolati clinici provengono da pazienti sottoposti ad interventi chirurgici presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli e fanno parte della numerosa collezione della Biobanca del Laboratorio di Patologia delle Infezioni associate all'Impianto dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, diretto dalla Prof.ssa Carla Renata Arciola. Tutti i ceppi sono stati successivamente sottoposti a ribotipizzazione automatica mediante il RiboPrinter® Microbial Characterization System (DuPont Qualicon, Willmington, DE, USA) e classificati in ribogruppi dal RiboPrinter® in base alla similarità dei patterns dei ribotipi (Arciola et al., 2007).

Le tabelle 6 e 7 mostrano le informazioni dettagliate degli isolati impiegati nella sperimentazione.

Ceppi Batterici		
Nome	N°	Origine
<i>S. aureus</i>: isolato clinico ortopedico (1)		
	1	FE
Ceppo di riferimento (1)		
<i>S. aureus</i> ATCC25923	1	Ceppo clinico isolato nel 1945
<i>S. epidermidis</i>: isolati clinici ortopedici (7)		
	4	H
	1	K
	1	FI
	1	Infezione post-chirurgica
<i>S. lugdunensis</i>: isolati clinici ortopedici (5)		
	3	FI
	1	FE
	1	no MDs
<i>E. faecalis</i> (2)		
	1	H
	1	FI

Tabella 6: Lista degli isolati batterici impiegati nella sperimentazione. Nella tabella è descritta l'origine degli isolati batterici usati (no MDs, infezione non associata a dispositivo medico; H, infezione associata a protesi d'anca; K, infezione associata a protesi di ginocchio; FE, infezione associata a fissatori esterni; FI, infezione associata a fissatori interni).

Specie batterica	Ribogruppo	N°
<i>S. epidermidis</i>	cra-63-S-7	2
	cra-119-S-4	1
	cra-92-S-5	1
	cra-122-S-2	1
	cra-80-S-1	1
	cra-63-S-4	1
<i>S. lugdunensis</i>	cra-62-S-1	2
	cra64-S-8	2
	cra-74-S-5	1
<i>E. faecalis</i>	cra-116-S-1	1
	cra-115-S-8	1
<i>S. aureus</i>	cra-119-S-8	1

Tabella 7: Dati di ribotipizzazione degli isolati impiegati nella sperimentazione.

Allestimento delle colture cellulari MG-63

Le cellule MG-63 sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti ad una densità di 5×10^3 cellule/pozzetto (100 μ l) in terreno completo privo di antibiotici (MEM supplementato con il 10% FBS e L-glutamina 2mM). La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 24 ore. Dopo 24 ore il numero delle cellule MG-63 in ciascun pozzetto è pari a circa 1×10^4 ; il calcolo del numero di cellule MG-63 per pozzetto dopo 24 ore dalla semina è stato effettuato in 3 esperimenti indipendenti ed il valore calcolato è stato pari a $1.0 \pm 0.8 \times 10^4$ cellule/pozzetto.

Preparazione dell'inoculo batterico

I ceppi batterici stoccati a -80°C sono stati scongelati e piastrati con un'opportuna ansa in TSA (Tryptical Soy Agar), un terreno non selettivo che viene mantenuto in coltura in termostato a 37°C per 24 ore. Per il test di internalizzazione, una colonia cresciuta in piastra TSA è stata inoculata in TB (Tryptose Broth) ed è stata mantenuta in termostato a 37°C per circa 18 ore. La sospensione batterica è stata centrifugata ed il pellet è stato risospeso nel terreno costituito da MEM supplementato con il 10% FBS e L-glutammina 2mM. La concentrazione batterica è stata stimata con la lettura della densità ottica a 550 nm utilizzando lo spettrofotometro Hewlett Packard G1103A. Per ciascuna specie batterica analizzata è stata studiata la correlazione densità ottica-CFU (Colony Forming Unit) e le equazioni delle rette di regressione sono state usate per l'allestimento dell'inoculo batterico con cui infettare il monostrato di cellule MG-63. Per ciascun inoculo batterico sono state allestite delle diluizioni in terreno costituito da MEM supplementato con il 10% di FBS e L-glutammina 2mM e nell'analisi dei dati sono stati presi in considerazione i valori di CFU/pozzetto infettati con una M.O.I. di circa 100:1. Pertanto al fine di conoscere il valore esatto di M.O.I. con cui è stato condotto il saggio di internalizzazione, ciascun inoculo è stato quantificato. (Figura 12).

Saggio di internalizzazione

Il saggio di internalizzazione di isolati clinici è stato effettuato su piastre da 96 pozzetti secondo lo schema riportato in Figura 15.

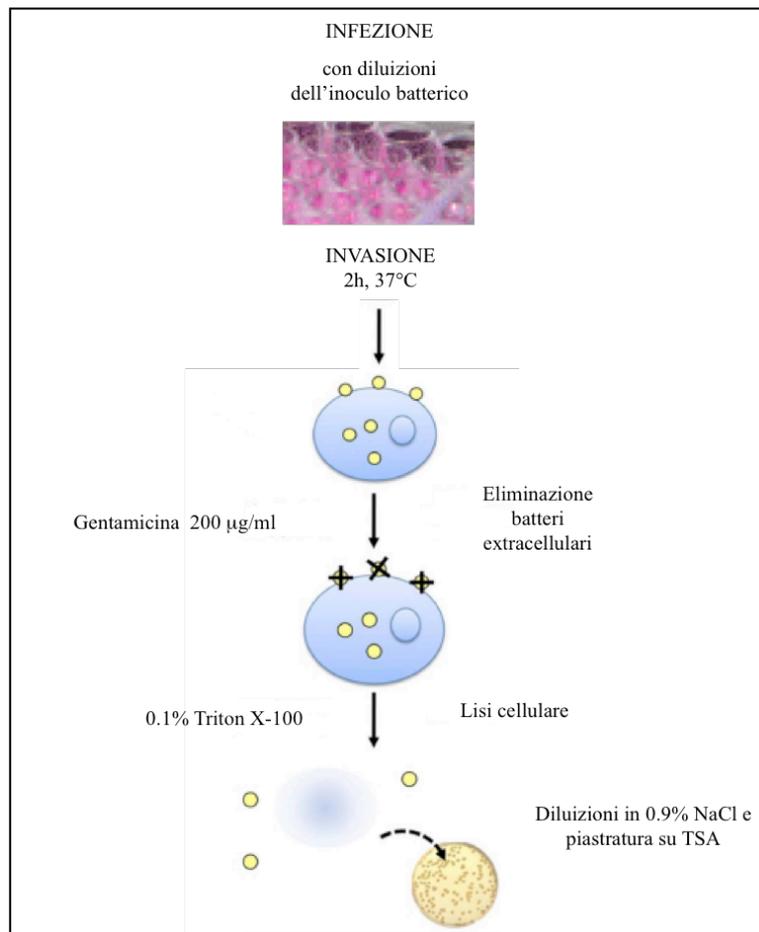


Figura 15: Schema sperimentale del saggio di internalizzazione di isolati clinici provenienti da infezioni ortopediche in cellule MG-63 (Figura modificata da Valour et al., 2013).

Prima di procedere all'infezione ciascun pozzetto è stato lavato una volta con 200 µl di D-PBS. Per ciascun isolato clinico sono state allestite alcune diluizioni dell'inoculo batterico e ciascuna è stata testata in triplicato. 100 µl di ogni diluizione dell'inoculo batterico in terreno completo (MEM supplementato con 10% di FBS e L-glutammina 2mM) sono stati aggiunti in ciascun pozzetto. La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 2 ore. In seguito all'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato 4 volte con 200 µl di D-PBS e quindi è

stato trattato con 200 μ l di terreno completo (MEM supplementato con il 10% di FBS e L-glutammina 2mM) supplementato con 200 μ g/ml di gentamicina. La piastra è stata incubata in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% e con CO₂ al 5% per 2 ore. Al termine dell'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato con 200 μ l di D-PBS e quindi trattato con 150 μ l di 0.1% di Triton X-100 per 5 minuti a 37°C in modo che avvenga la lisi delle cellule eucariotiche e il conseguente rilascio dei batteri intracellulari. I lisati cellulari degli isolati clinici di *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* sono stati direttamente seminati in piastre TSA, mentre per i lisati cellulari degli isolati di *S. aureus* è stato necessario effettuare delle diluizioni seriali in 0.9% di NaCl prima di procedere alla piastratura su TSA. Le piastre sono state poste in termostato a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stata eseguita la conta delle CFU.

2.5 VISUALIZZAZIONE DELLE NETs

Il ruolo della immunità innata nella difesa contro il biofilm batterico è stato studiato nell'ambito di una collaborazione fra il Laboratorio di Patologia delle Infezioni Associate all'Impianto dell'Istituto Rizzoli e il Laboratorio di Immunologia dell'Università di Heidelberg (Direttore Prof.ssa G.M. Hänsch) e sviluppato durante il periodo di soggiorno all'estero previsto dal Dottorato.

L'interazione fra il biofilm batterico e i neutrofili umani è stata studiata usando il ceppo di riferimento di *S. epidermidis* RP62A noto per essere biofilm formatore. La sospensione batterica di *S. epidermidis* RP62A (6.67×10^4 batteri/ml) è stata seminata in ciascun pozzetto delle Chamber Slide (Lab-Tek-II, Nunc). Le chamber slide sono state incubate in termostato a 37°C, per 48 ore, in agitazione (60 RPM). Al termine dell'incubazione i batteri planctonici sono stati rimossi ed il biofilm è stato lavato con il buffer costituito da HBSS + 0.5% BSA. Prima di aggiungere i PMN, il biofilm è stato incubato con il 20% di siero umano (NHS) per 20 minuti a 37°C in agitazione (60

RPM). In parallelo alcuni pozzetti sono stati incubati solo con il buffer.

I polimorfonucleati umani sono stati isolati da donatori sani e quindi sono stati aggiunti a ciascun pozzetto (0.5×10^6 PMN/pozzetto). Come controlli sono stati usati i PMN da soli (controllo negativo) e i PMN attivati con 25nM di PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetate, Sigma-Aldrich), un potente induttore delle NETs (Brinkmann et al., 2004), che pertanto rappresenta il controllo positivo (Figura 16).

PMN	Biofilm <i>S. epidermidis</i> + PMN	Biofilm <i>S. epidermidis</i> + 20% Siero umano + PMN	PMN + PMA
PMN	Biofilm <i>S. epidermidis</i> + PMN	Biofilm <i>S. epidermidis</i> + 20% Siero umano + PMN	PMN + PMA

Figura 16: Schema dell'organizzazione delle Chamber Slide.

Le chamber slide sono state incubate in termostato a 37°C per 4 ore; in letteratura è stato dimostrato che il rilascio del DNA da parte dei PMN attivati in seguito al contatto con il biofilm si osserva tra le 3 e le 6 ore di incubazione (Meyle et al., 2012). Al termine dell'incubazione il sovrantante contenente il DNA rilasciato dai PMN attivati è stato raccolto ed è stato quantificato mediante il kit “Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and kits” (Invitrogen); la fluorescenza (480, λ eccitazione; 520, λ emissione) è stata misurata con un lettore di micropiastre a fluorescenza (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter). Tale kit si basa su un colorante fluorescente altamente specifico per il DNA a doppio filamento (dsDNA). Al termine dell'incubazione con i PMN, alcuni pozzetti sono stati trattati con DNAsi (2ng/ml) per 1 ora a 37°C; al termine dell'incubazione il supernatante è stato raccolto ed il DNA, in esso contenuto, è stato quantificato.

Le cellule e il biofilm presenti nei pozzetti delle chamber slide sono stati fissati con di

paraformaldeide 4% in PBS per 15 minuti a 37°C. Dopo aver lavato con il buffer (HBSS + 0.5% BSA) ciascun pozzetto, è stata aggiunta una soluzione al 5% di Normal Goat Serum in PBS per 18 ore a +4°C. Per visualizzare l'elastasi è stato usato un anticorpo specifico per l'elastasi umana (diluito 1:150) (Mouse anti-human elastase, Dako); dopo 45 minuti di incubazione a temperatura ambiente, è stato aggiunto un anticorpo secondario anti-mouse IgG coniugato con Cy3 (diluito 1:250) per 1 ora a temperatura ambiente al buio. Sono stati effettuati dei lavaggi con il buffer, quindi le chamber slide sono state incubate con il colorante Sytox Green (diluito 1:7500) (Invitrogen) per 20 minuti a temperatura ambiente al buio al fine di visualizzare il DNA rilasciato dai PMN. I vetrini sono stati montati con un montante fluorescente (Dako) e sono stati osservati al microscopio a fluorescenza KEYENCE.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI MG-63

Le cellule MG-63, una volta messe in coltura come descritto in “Materiali e Metodi”, hanno mostrato una morfologia fibroblastoide tipica della linea di osteosarcoma umano (Figura 17).

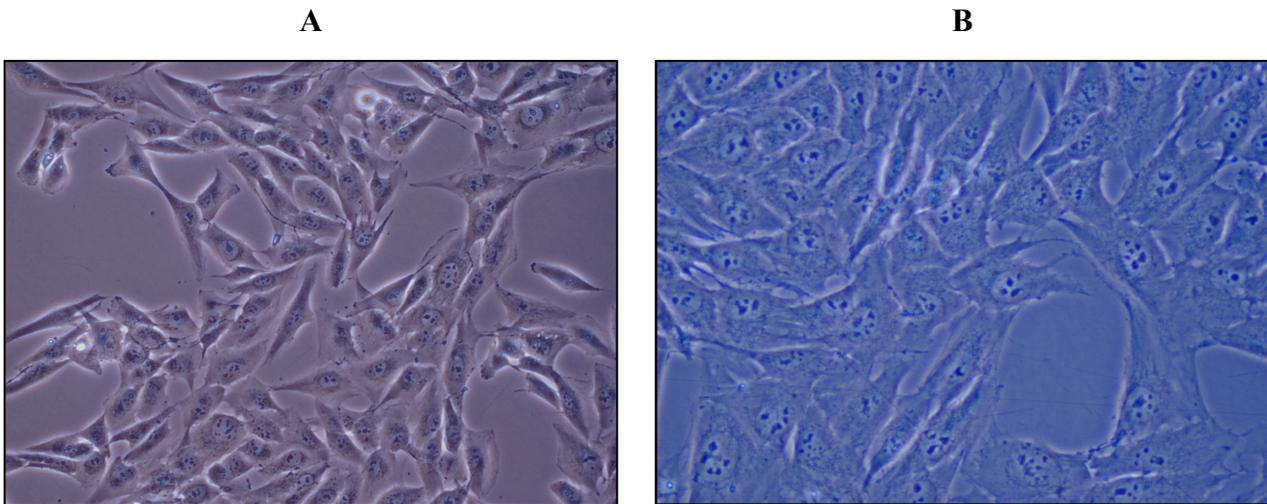


Figura 17: Morfologia fibroblastoide delle cellule MG-63 in coltura. Osservazione al microscopio ottico invertito Nikon Eclipse TE300. A: ingrandimento 20X, B: ingrandimento 40X.

3.2 VALUTAZIONE DELLA MINERALIZZAZIONE DELLE CELLULE MG-63

La capacità delle cellule MG-63 di mineralizzare è stata valutata mediante una colorazione istochimica diretta basata sul Rosso di Alizarina. Il monostrato cellulare, dopo 23 giorni di coltura, è in grado di depositare i noduli minerali, come mostra la Figura 18. Questo risultato conferma la documentata capacità osteogenica della linea

cellulare di sarcoma osseo, MG-63. Pertanto la linea cellulare MG-63 rappresenta un ottimo modello per lo studio dell'interazione tra isolati clinici batterici e tessuto osseo.

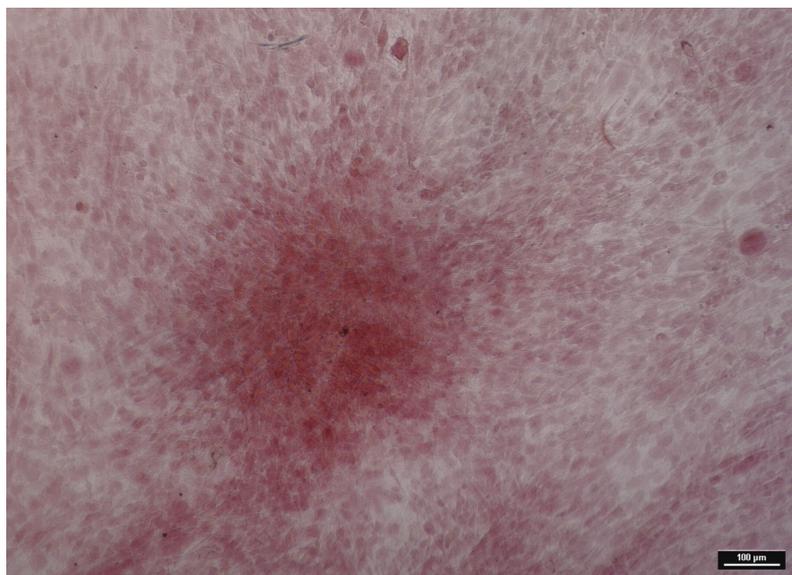


Figura 18: Mineralizzazione evidenziata con la colorazione rosso di Alizarina. Le cellule MG-63 dopo 23 giorni di coltura mostrano i noduli minerali. Osservazione al microscopio ottico invertito Nikon Eclipse TE300.

3.3 INTERNALIZZAZIONE DI ISOLATI CLINICI NELLE CELLULE MG-63

Il saggio di internalizzazione usato nel lavoro sperimentale costituisce un metodo sensibile in grado di identificare i patogeni capaci di invadere le cellule eucariotiche. Il metodo messo a punto per valutare il potenziale invasivo delle specie batteriche associate ad infezioni ortopediche nelle cellule MG-63 è effettuato su micropiastra. Per una corretta validazione, il metodo prevede l'impiego non solo di isolati di controllo, positivo e negativo, in ogni piastra, ma anche di pozzetti vuoti, non contenenti cioè le cellule MG-63 ma infettati solo con le sospensioni batteriche, al fine di valutare sia un'eventuale background di adesione batterica, sia un'eventuale sopravvivenza

batterica. L'internalizzazione batterica di solito è valutata in seguito alla lisi delle cellule eucariotiche infettate e al conseguente rilascio dei batteri intracellulari, dopo un opportuno trattamento al fine di eliminare i batteri extracellulari al termine del periodo di infezione. La gentamicina, essendo un antibiotico impermeabile alle cellule eucariotiche, di solito è impiegata per questo scopo, tuttavia il suo utilizzo è limitato unicamente agli isolati batterici sensibili agli antibiotici aminoglicosidici. Il trattamento combinato di gentamicina e lisostafina B, descritto in letteratura (Wu et al., 2003), è stato impiegato in questo lavoro sperimentale, al fine di valutare la possibilità di eliminare efficacemente i microrganismi extracellulari, anche nel caso di batteri resistenti agli antibiotici aminoglicosidici, e quindi di studiare il loro potenziale invasivo.

Nella preparazione dell'inoculo abbiamo superato il problema della impossibilità di ottenere un'accurata valutazione delle CFU a partire dalla densità ottica quantificando sempre l'inoculo con cui è stata effettuata l'infezione, al fine di conoscere, per ogni esperimento, la M.O.I. esatta. Questo approccio poco usato in letteratura consente un'analisi più precisa.

Il saggio di internalizzazione basato su micropiastra costituisce un metodo dotato di una buona riproducibilità e di una buona sensibilità, in quanto è capace di rilevare un tasso di internalizzazione di circa 2 batteri internalizzati per 1×10^4 cellule eucariotiche (cellule presenti in un pozzetto), cioè 0.02%. L'isolato clinico di *S. lugdunensis* cra1750, usato come controllo negativo, ha un livello di internalizzazione di circa $0.16 \pm 0.18\%$, cioè 16 CFU per 10^4 cellule MG-63 (0.0016% dell'inoculo).

L'isolato clinico di *S. aureus* cra1199, usato come controllo positivo, mostra un livello di internalizzazione di $4.9 \pm 11.7 \times 10^4$ CFU per 1×10^4 cellule MG-63 (circa 7,5% dell'inoculo), ciò significa che in media si osservano circa 5 batteri in ciascuna cellula MG-63.

I pozzetti "vuoti" infettati con gli isolati di controllo, cra1750 e cra1199, hanno mostrato sempre un conteggio di CFU pari a 0.

Per il calcolo del numero delle CFU delle sospensioni batteriche diluite e dei batteri intracellulari è stata usata la seguente formula (Maiello e Spolaor, 2011):

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

N = numero di microrganismi presenti nel campione

$\sum C$ = somma delle conte delle colonie in tutte le piastre considerate alle due successive diluizioni;

con $8 \leq C \leq 334$

V = volume di inoculo per ciascuna piastra Petri

n1 = numero delle piastre alla prima diluizione considerata

n2 = numero delle piastre alla seconda diluizione considerata

d = diluizione dell'inoculo distribuito nella prima piastra presa in considerazione nella conta

Internalizzazione di isolati clinici di *S. epidermidis* sensibili agli antibiotici aminoglicosidici

L'analisi della capacità invasiva degli isolati clinici di *S. epidermidis* sensibili alla gentamicina, mostra, in assenza di cellule MG-63, una sopravvivenza batterica nulla. Tuttavia anche in presenza di cellule MG-63 il numero delle CFU riscontrate in ciascun pozzetto è estremamente basso e non comparabile a quello osservato per il controllo positivo *S. aureus* cra1199 e per l'isolato *S. aureus* di riferimento ATCC25923 che mostrano una conta rispettivamente di 4.9×10^4 e 1.9×10^4 per ciascun pozzetto (1×10^4 cellule MG-63) (Figura 19). Il numero maggiore di CFU ottenute nel caso degli isolati clinici di *S. epidermidis* è stato osservato con l'isolato cra1231 e corrisponde a circa 1 batterio internalizzato ogni 100 cellule MG-63 (106 CFU/pozzetto) (Figura 19).

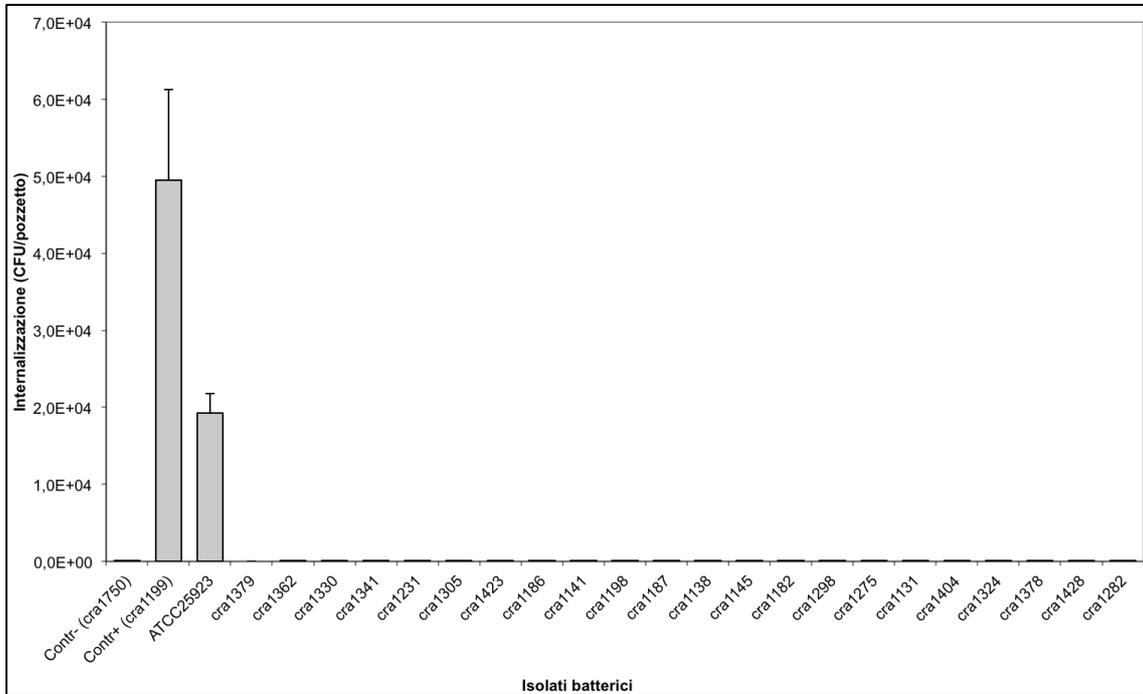


Figura 19: Internalizzazione batterica di differenti isolati clinici ortopedici di *S. epidermidis* rispetto ai controlli e all'isolato di riferimento di *S. aureus* (ATCC25923). Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

Considerando l'elevato inoculo utilizzato per l'infezione (M.O.I. 500:1), il numero di CFU riscontrato in seguito alla lisi delle cellule MG-63 è assolutamente marginale e non implica una capacità significativa del patogeno di invadere le cellule MG-63. La curva M.O.I.-CFU dell'isolato cra1231 (Figura 20) mostra che il plateau di internalizzazione è raggiunto in corrispondenza di una M.O.I. di circa 1000:1, in contrasto con quanto riscontrato da Khalil (Khalil et al., 2007) con l'isolato di *S. epidermidis* di riferimento NCTC11047 (M.O.I. 500:1).

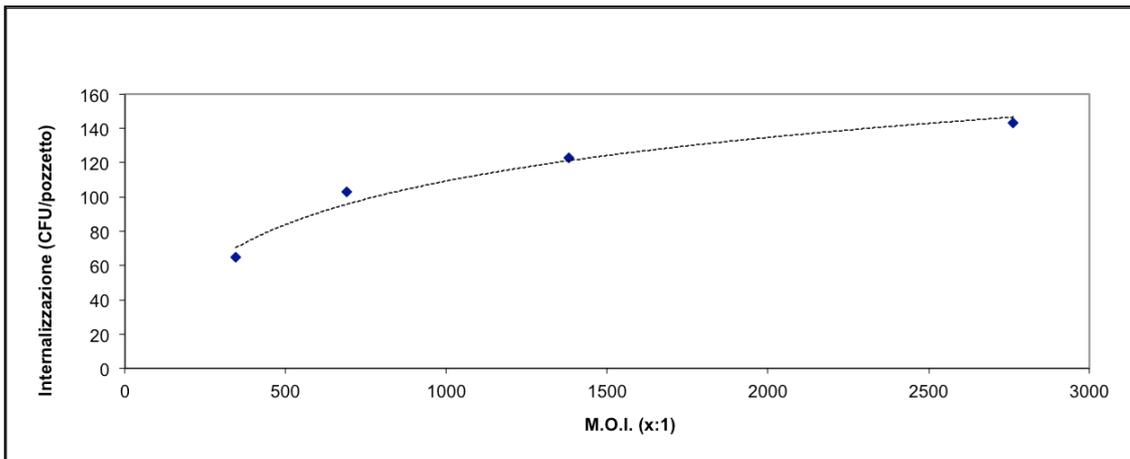


Figura 20: Curva M.O.I.-CFU dell'isolato clinico di *S. epidermidis* cra1231. Il grafico mostra le medie dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento effettuato in triplicato.

Questa differenza potrebbe essere legata al differente metodo di analisi usato o potrebbe suggerire che la curva di internalizzazione M.O.I.-CFU è isolato-specifica e potrebbe essere pertanto legata ad una serie di variabili come l'adesività del ceppo agli osteoblasti e a meccanismi molecolari specifici. In Figura 21 sono stati inseriti i dati relativi ai ribogruppi degli isolati testati, tuttavia nonostante le differenze riscontrate nell'inoculo e la modesta numerosità del campione, non è possibile stabilire nessuna associazione clonale con il grado di internalizzazione, ma è evidente che nessuno degli isolati testati mostri un livello di internalizzazione significativo. Il ribogruppo cra-63-S-7 include 3 isolati che mostrano un livello di internalizzazione relativamente alto (> 50 CFU), mentre il ribogruppo cra-122-S-2 comprende 3 isolati con un livello di internalizzazione minore (< 50 CFU). Inoltre alcuni ribogruppi sembrano mostrare una certa omogeneità in termini di CFU internalizzate, indipendentemente dal valore dell'inoculo, mentre altri mostrano una grande eterogeneità anche con inoculi simili.

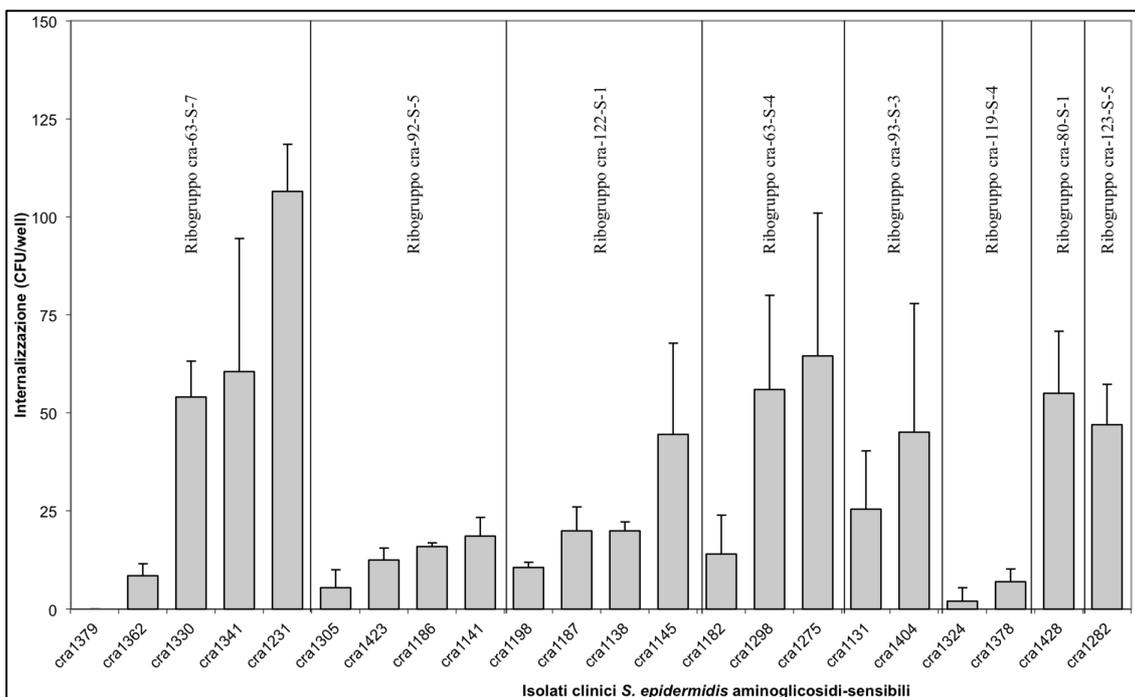


Figura 21: Internalizzazione batterica di 22 isolati clinici ortopedici di *S. epidermidis* aminoglicosidici-sensibili. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

Internalizzazione di isolati clinici di *S. epidermidis* resistenti agli antibiotici aminoglicosidici

Una limitazione degli attuali metodi in grado di studiare l'invasione batterica di cellule eucariotiche è rappresentata dalla impossibilità di eliminare i batteri extracellulari quando questi sono resistenti alle sostanze attualmente in uso. Nello studio è stata testata la combinazione di gentamicina e lisostafina, tuttavia sfortunatamente il trattamento non è risultato efficace nell'eliminare i batteri extracellulari e pertanto rimane ancora impossibile studiare la capacità di isolati resistenti alla gentamicina di invadere le cellule MG-63. Eccetto per l'isolato cra1281, per tutti gli altri isolati di *S.*

epidermidis resistenti alla gentamicina si osserva una differenza di CFU in presenza ed in assenza di cellule MG-63 (Figura 22).

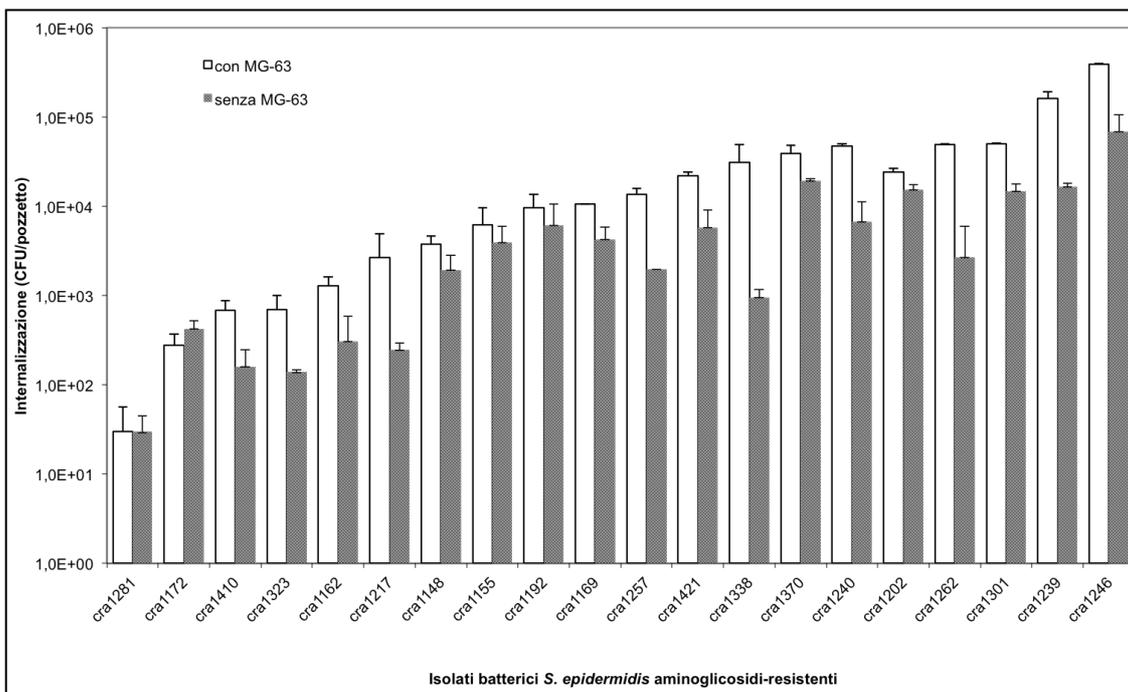


Figura 22: Internalizzazione/sopravvivenza batterica di 20 isolati clinici ortopedici di *S. epidermidis* aminoglicosidici-resistenti. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

Tale differenza potrebbe essere associata all'internalizzazione di una frazione di batteri nelle cellule MG-63 o ad una differente capacità adesiva dei batteri al fondo della piastra di plastica e alla superficie delle cellule MG-63. La Figura 23 mostra i risultati ottenuti nel saggio di adesione condotto su 4 isolati resistenti alla gentamicina e 3 isolati sensibili alla gentamicina. Per tutti e 7 gli isolati clinici di *S. epidermidis* testati, il numero di batteri adesi ai pozzetti contenenti le cellule MG-63 è 2.9-7.2 volte maggiore rispetto ai pozzetti "vuoti". Le differenze osservate nell'adesione batterica suggeriscono

che i pozzetti contenenti le cellule MG-63 costituiscono una superficie più porosa e più estesa per l'adesione batterica o che le cellule MG-63 hanno una superficie maggiormente adesiva per *S. epidermidis*. Un'aumentata capacità adesiva agli osteoblasti, mediata probabilmente dalle adesine stafilococciche, potrebbe spiegare le differenze riscontrate tra gli isolati di *S. epidermidis* resistenti alla gentamicina in termini di CFU in presenza ed in assenza di cellule MG-63.

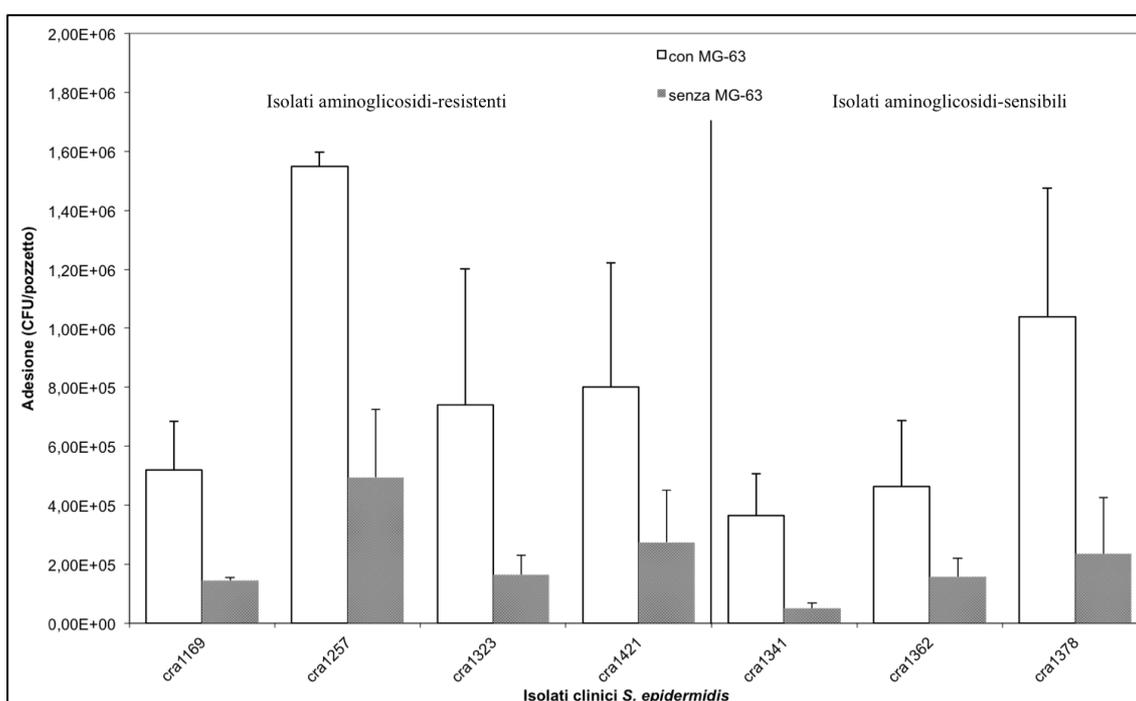


Figura 23: Differente adesione di isolati clinici di *S. epidermidis* sulla superficie delle cellule MG-63 e sul fondo dei pozzetti di plastica. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

Internalizzazione di isolati clinici di *S. lugdunensis*

Tutti gli isolati clinici di *S. lugdunensis* testati nello studio sono risultati sensibili al trattamento per l'eliminazione dei batteri extracellulari, infatti la conta di CFU in assenza di cellule MG-63 risulta essere pari a 0.

Tuttavia anche in presenza di cellule MG-63 il numero delle CFU riscontrate in ciascun pozzetto è estremamente basso e non comparabile a quello osservato per il controllo positivo *S. aureus* cra1199 (Figura 24).

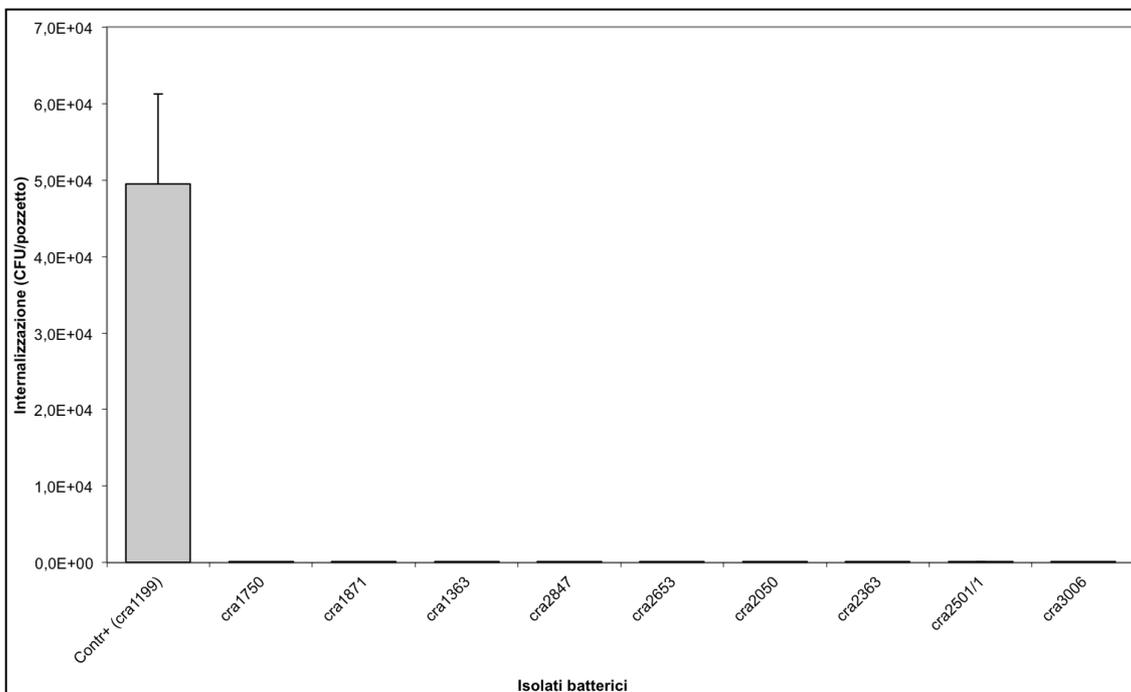


Figura 24: Internalizzazione batterica di 9 differenti isolati clinici ortopedici di *S. lugdunensis* rispetto al controllo positivo (cra1199). Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

L'isolato clinico cra1750 è stato testato a 3 differenti M.O.I. (Figura 25), tuttavia, nonostante la differenza nell'inoculo usato, non sono state osservate differenze importanti in termini di CFU riscontrate. Tutti e quattro gli isolati clinici di *S. lugdunensis* appartenenti al ribogruppo epidemico cra-62-S-1 hanno mostrato un basso livello di internalizzazione, paragonabile a quello osservato per cra1750. L'isolato dotato di un maggior potere invasivo, cra2653, mostra un'internalizzazione di solo lo 0.0007% dell'inoculo (M.O.I. 321:1) e solo lo 0.2% delle cellule MG-63 risultano contenere i batteri intracellulari (circa 25 CFU/pozzetto). Nonostante l'inoculo sia grande (> 1000 M.O.I.), gli altri isolati del ribogruppo, cra1871, cra1363 e cra2847, mostrano una minore internalizzazione. Gli isolati appartenenti al ribogruppo cra-64-S-8 sono stati testati con una M.O.I. pari o superiore a 1000:1, tuttavia il range di CFU riscontrato è compreso tra 17 (isolato cra3006) e 62 (isolato cra2501/1) per pozzetto. Tuttavia non è possibile stabilire nessuna associazione clonale con il grado di internalizzazione, che risulta essere estremamente basso e paragonabile a quello osservato per gli isolati clinici di *S. epidermidis*.

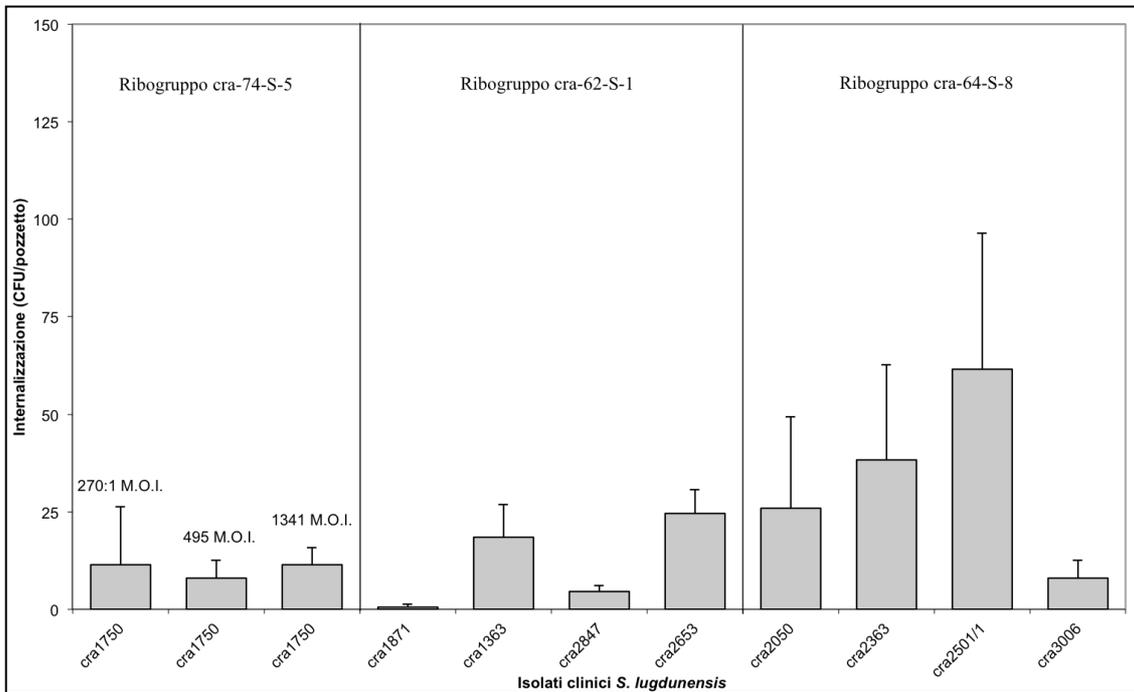


Figura 25: Internalizzazione batterica di differenti isolati clinici ortopedici di *S. lugdunensis*. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

Internalizzazione di isolati clinici di *E. faecalis*

L'analisi della capacità invasiva degli isolati clinici di *E. faecalis* sensibili alla gentamicina, mostra, in assenza di cellule MG-63, una sopravvivenza batterica nulla. Tuttavia anche in presenza di cellule MG-63 il numero delle CFU riscontrate in ciascun pozzetto è estremamente basso e non comparabile a quelli osservati per il controllo positivo *S. aureus* cra1199 (Figura 26).

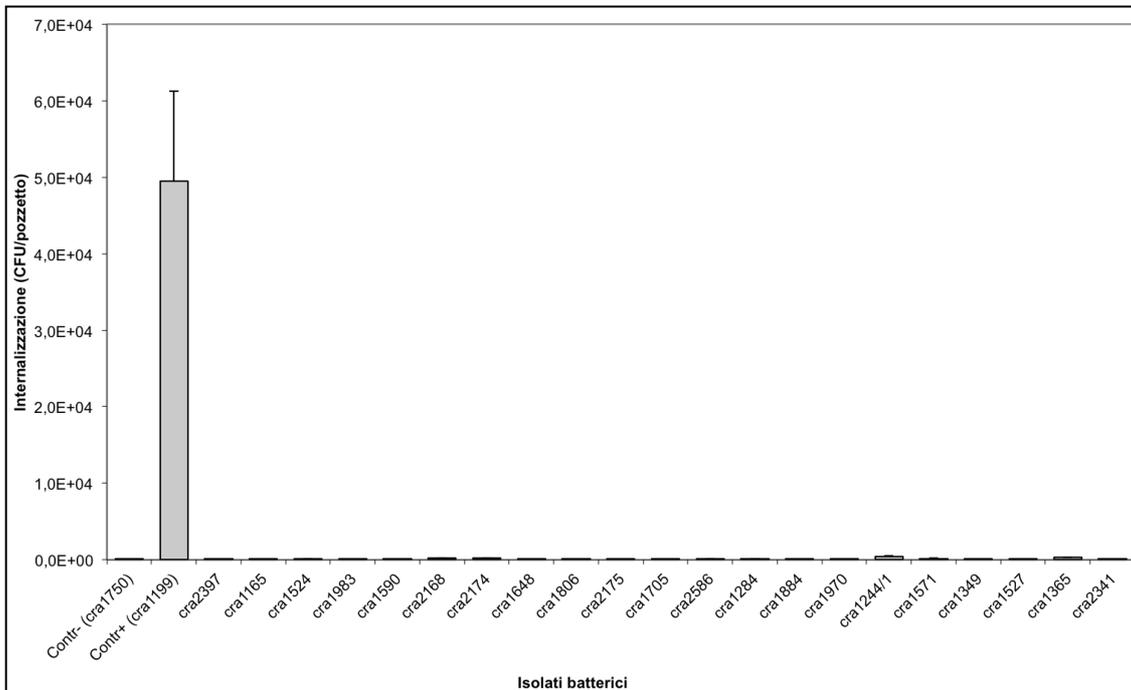


Figura 26: Internalizzazione batterica di differenti isolati clinici ortopedici di *E. faecalis* rispetto ai controlli. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

Il numero maggiore di CFU ottenute nel caso degli isolati clinici di *E. faecalis* è stato osservato con l'isolato cra1244/1 e corrisponde a circa 1 batterio internalizzato ogni 25 cellule MG-63 (402 CFU/pozzetto). Considerando l'elevato inoculo utilizzato per l'infezione (M.O.I. 1000:1), il numero di CFU riscontrato in seguito alla lisi delle cellule MG-63 è assolutamente marginale e non implica una capacità significativa del patogeno di invadere le cellule MG-63. La curva M.O.I.-CFU dell'isolato cra1274 (Figura 27) mostra che il plateau di internalizzazione è raggiunto in corrispondenza di una M.O.I. di circa 2000:1, in contrasto con quanto riscontrato da Millán (Millán et al., 2013) (M.O.I. 1000:1) con le cellule endoteliali. Tuttavia questa differenza avvalorava l'ipotesi secondo la quale la curva di internalizzazione M.O.I.-CFU è isolato-specifica.

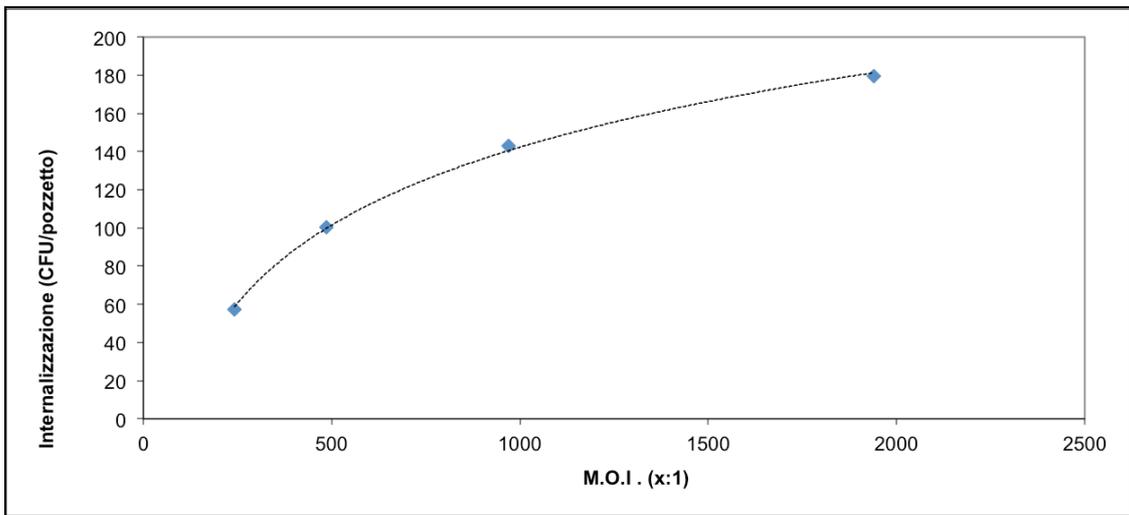


Figura 27: Curva M.O.I.-CFU dell'isolato clinico di *E. faecalis* cra2174. Il grafico mostra le medie dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento effettuato in triplicato.

In Figura 28 sono stati inseriti i dati relativi ai ribogruppi degli isolati testati: è possibile notare che esiste una enorme eterogeneità tra i ribogruppi considerati, tuttavia gli isolati dei ribogruppi cra-115-S-2, cra-116-S-7, cra-115-S-8 e cra-118-S-1 mostrano un livello di internalizzazione più basso (range 1-86 CFU/pozzetto) rispetto ai ribogruppi cra-116-S-1, cra-115-S-4 e cra-118-S-2 (range 16-402 CFU/pozzetto). Non è possibile comunque stabilire nessuna associazione clonale con il grado di internalizzazione, ma è evidente che nessuno degli isolati testati mostra un livello di internalizzazione significativo.

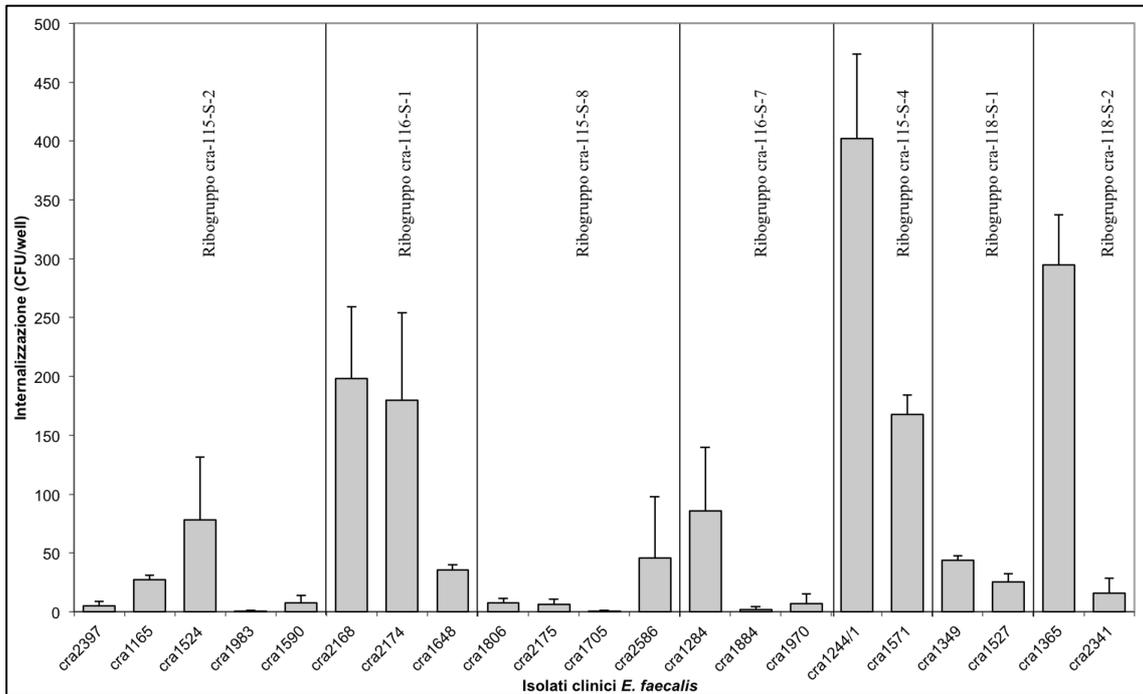


Figura 28: Internalizzazione batterica di 21 differenti isolati clinici ortopedici di *E. faecalis*. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard dei valori di CFU/pozzetto di un esperimento rappresentativo effettuato in triplicato.

La capacità invasiva di *S. aureus* nelle cellule eucariotiche è stata ampiamente documentata nel corso degli ultimi anni (Hamza et al., 2013) ed i risultati ottenuti con l'isolato di riferimento ATCC25923 e con l'isolato clinico ortopedico cra1199 confermano i dati della letteratura secondo cui *S. aureus* è capace di invadere diversi tipi di cellule eucariotiche, tra cui gli osteoblasti. Al contrario poche sono le informazioni che riguardano l'invasività del patogeno emergente *S. epidermidis* in cellule eucariotiche. Le prime evidenze bibliografiche mostravano una capacità invasiva di *S. epidermidis* e di altri stafilococchi coagulasi-negativi nelle cellule mammarie bovine (Almeida e Oliver, 2001). Tuttavia è solo nel 2007 che Khalil ed i suoi collaboratori hanno dimostrato la capacità di alcuni ceppi di *S. epidermidis* di invadere gli osteoblasti umani (Khalil et al., 2007). Nello studio di Khalil solo 3 degli isolati di *S.*

epidermidis testati mostravano un livello di internalizzazione considerevole negli osteoblasti. Dei 3 ceppi invasivi fanno parte l'isolato di riferimento NCTC11047 e 2 isolati clinici, uno associato a peritonite (isolato "19") e l'altro associato ad osteomielite (isolato "HB"). La capacità invasiva dell'isolato di riferimento NCTC11047 è stata confermata (sebbene risulti essere inferiore a quella mostrata nello studio di Khalil) da un recente studio condotto dal gruppo di Valour su colture cellulari di osteoblasti umani e di MG-63 (Valour et al., 2013).

La capacità invasiva di *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* è stata poco considerata fin'ora, sebbene queste specie batteriche siano frequentemente associate ad infezioni umane importanti, come l'osteomielite. Nel 2011, per la prima volta, è stata dimostrata la capacità di alcuni isolati clinici di *S. lugdunensis* di invadere le cellule epiteliali ed endoteliali (Szabados et al., 2011), mentre, più recentemente, nel 2013 è stata osservata, sempre per la prima volta, l'internalizzazione di cellule endoteliali da parte di isolati clinici di *E. faecalis* (Millán et al., 2013).

Nel presente studio è stata analizzata la capacità di un numero considerevole di isolati clinici provenienti da infezioni ortopediche associate all'impianto di invadere gli osteoblasti, al fine di valutare l'eventuale ruolo dell'internalizzazione nella patogenesi delle osteomieliti associate all'impianto.

I dati ottenuti mostrano che per il ceppo di *S. epidermidis* cra1231, l'isolato clinico che ha evidenziato una maggiore capacità invasiva tra i 22 isolati sensibili agli antibiotici aminoglicosidici, solo lo 0.002% dell'inoculo viene internalizzato e lo stesso risultato è stato osservato anche per l'isolato clinico di *E. faecalis* cra1244/1. Parallelamente, per l'isolato maggiormente invasivo tra i ceppi di *S. lugdunensis*, cra2653, solo lo 0.007% dell'inoculo risulta essere internalizzato. Pertanto gli isolati clinici di *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* analizzati non sembrano possedere la capacità di invadere significativamente gli osteoblasti, al contrario dell'isolato clinico di *S. aureus*, in cui il 7.5% dell'inoculo risulta essere internalizzato nelle cellule MG-63. Inoltre in *S. aureus* l'internalizzazione si osserva con un inoculo modesto (circa 100 M.O.I.), questo

potrebbe essere dovuto ad una rapida ed efficace adesione batterica sulla superficie cellulare che favorisce il successivo ingresso di *S. aureus* nelle cellule eucariotiche. Studi precedenti hanno dimostrato una minore adesione di *S. epidermidis* agli osteoblasti e questo potrebbe implicare la necessità di un inoculo maggiore per raggiungere la stessa adesione dei batteri alla superficie cellulare. Tuttavia anche quando si utilizzano inoculi considerevoli, la capacità invasiva di *S. epidermidis* risulta essere modesta e marginale.

In presenza di un'invasione estremamente bassa (<1%), potrebbe non essere appropriato parlare di internalizzazione vera e propria, intesa come un fenomeno attivo che coinvolge specifici meccanismi cellulari di trasduzione del segnale. Il basso livello d'internalizzazione osservato tra gli isolati clinici di *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* potrebbe essere semplicemente dovuto ad un fenomeno non specifico di internalizzazione passiva all'interno degli osteoblasti. Le modeste variazioni osservate in termini di CFU internalizzate tra gli isolati considerati potrebbero essere legate ad una differente capacità adesiva dei vari isolati alla superficie degli osteoblasti piuttosto che a specifici fattori di virulenza coinvolti nel meccanismo attivo di invasione cellulare.

3.4 RUOLO DELL'INTERNALIZZAZIONE NELLA PATOGENESI DELL'OSTEOMIELITE

L'eradicazione delle infezioni associate agli impianti protesici è un aspetto estremamente importante alla base del successo di una protesi. Tra i meccanismi patogenetici ipotizzati essere alla base di questo tipo di infezioni vi è l'invasione degli osteoblasti da parte dei microrganismi infettanti che possono così nascondersi nell'ambiente intracellulare ed eludere la terapia antibiotica sistemica, in quanto le cellule eucariotiche sono impermeabili a molti dei comuni antibiotici impiegati in

clinica (Arciola et al., 2012b). Pertanto è fondamentale analizzare il ruolo del processo invasivo dei principali microrganismi coinvolti nelle osteomieliti associate all'impianto, al fine di identificare la migliore terapia antibiotica da intraprendere nel corso di questo tipo di infezioni.

I dati della letteratura mostrano che lo studio dell'internalizzazione generalmente viene effettuato a differenti valori di M.O.I. per ciascuna specie batterica in base al plateau di internalizzazione osservato, tuttavia, sulla base dei risultati ottenuti, è ipotizzabile che il plateau di internalizzazione non sia specie-specifico, bensì ceppo-specifico. Inoltre l'impiego di M.O.I. differenti non consente un confronto tra le diverse specie batteriche. Pertanto alla luce di queste considerazioni, volendo studiare la capacità invasiva, nelle cellule osteoblastoidi MG-63, di isolati clinici appartenenti alle specie batteriche maggiormente coinvolte nelle infezioni ortopediche associate all'impianto, il saggio di internalizzazione è stato condotto ad una M.O.I. di circa 100:1. Per ciascun isolato le cellule MG-63 sono state infettate con delle diluizioni dell'inoculo batterico e quindi, nell'analisi dei dati, sono stati presi in considerazione i conteggi di CFU/pozzetto ottenuti con una M.O.I. di circa 100:1 (100 ± 33). La figura 29 descrive chiaramente la differente capacità invasiva delle specie batteriche considerate nello studio: gli isolati di *S. aureus* mostrano uno spiccato livello di internalizzazione dell'ordine di 10^4 batteri/pozzetto, contrariamente a quanto si può osservare per gli isolati di *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *E. faecalis* in cui il livello di internalizzazione è decisamente inferiore. Inoltre è interessante sottolineare che all'interno della stessa specie batterica, gli isolati considerati mostrano un comportamento invasivo paragonabile. I conteggi delle CFU internalizzate con gli isolati di *S. epidermidis* ed *E. faecalis* sono simili (nell'ordine di grandezza di 10^1 batteri/pozzetto) e leggermente superiori a quelli ottenuti con gli isolati di *S. lugdunensis* (nell'ordine di grandezza di 10^0 batteri/pozzetto) (Figura 29).

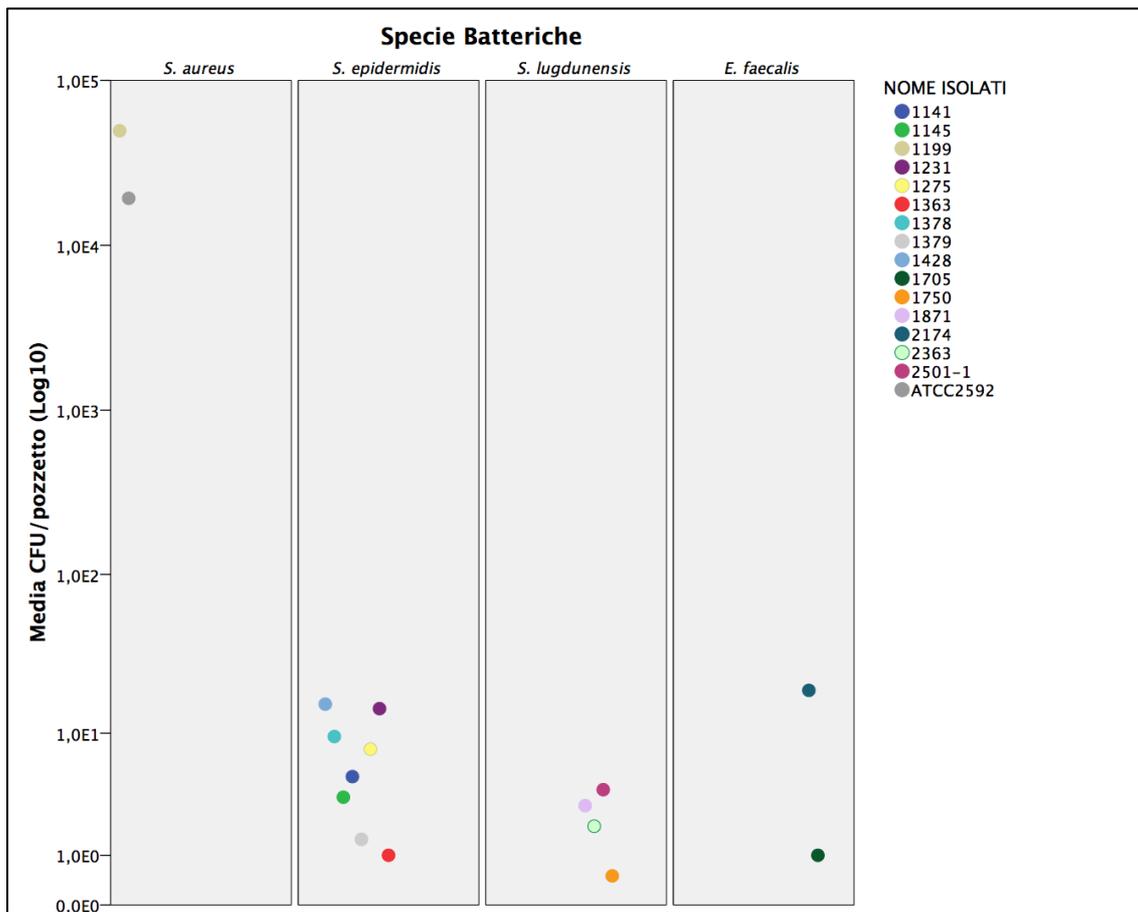


Figura 29: Capacità invasiva delle principali specie batteriche alla base di infezioni ortopediche associate all'impianto. Ogni cerchio rappresenta la media dei valori di CFU/pozzetto ottenuti in 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato per ciascun diverso ceppo batterico.

Limitatamente agli isolati considerati nello studio si può affermare che l'invasione delle cellule MG-63 non rappresenta un meccanismo patogenetico alla base delle infezioni ortopediche associate all'impianto causate da *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis*, al contrario, in *S. aureus* la spiccata capacità invasiva rappresenta una abile strategia patogenetica che consente al patogeno di sfuggire alla terapia sistemica e alla risposta immunitaria dell'ospite. Pertanto alla luce dei risultati ottenuti, la terapia per le

infezioni associate all'impianto causate da *S. aureus* dovrebbe prevedere l'uso di antibiotici permeabili alle cellule dell'ospite e pertanto attivi a livello intracellulare, al contrario nelle infezioni ortopediche causate da *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* non risulterebbe essere necessario l'uso di antibiotici attivi nella cellula.

3.5- LE NETs ED IL BIOFILM

I PMN rappresentano la prima linea di difesa del sistema immunitario contro le infezioni batteriche. I PMN sono dotati di numerose attività battericide ben documentate, come la fagocitosi, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e la degranolazione con il conseguente rilascio di vari peptidi antimicrobici come il lisozima, la lattoferrina e l'elastasi. Recentemente è stato descritto un'ulteriore capacità antibatterica dei PMN: la formazione di trappole extracellulari, NETs, (Neutrophil Extracellular Traps, ma anche *net*, rete) costituite da DNA, istoni, proteine citoplasmatiche e granulari dei PMN in grado di controllare l'infezione batterica (Arciola, 2010).

In seguito all'incubazione del biofilm opsonizzato di *S. epidermidis* (ceppo di riferimento RP62A) con i PMN si osserva la formazione delle NETs da parte dei neutrofili: i PMN attivati dal contatto con il biofilm opsonizzato hanno rilasciato il DNA (rilevato dal SYTOX) e l'elastasi (rilevata dall'anticorpo anti-elastasi umana coniugato con Cy3), una potente proteina battericida (Figura 30).

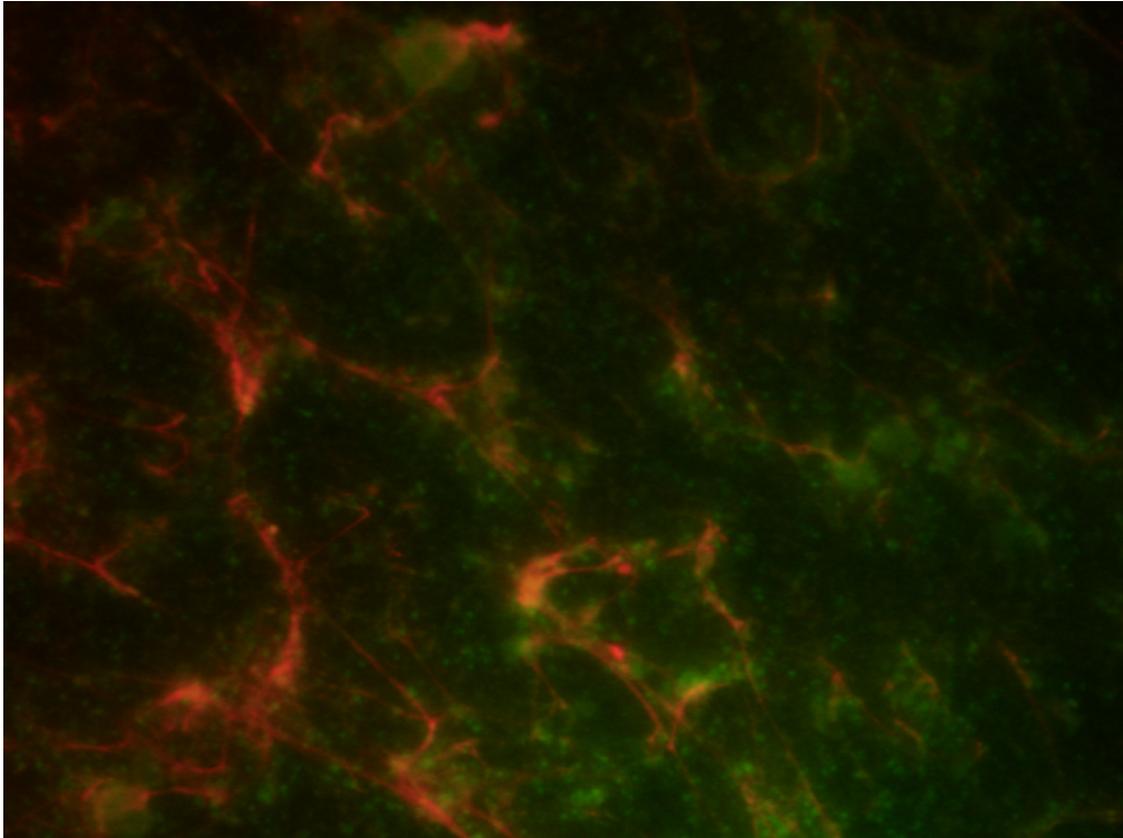


Figura 30: Formazione delle NETs. La figura mostra il DNA (in verde) e l'elastasi (in rosso) rilasciati da parte dei PMN attivati dal contatto con il biofilm di *S. epidermidis* opsonizzato con il siero umano. Osservazione al microscopio a fluorescenza KEYENCE.

Il rilascio del DNA è stato anche quantificato mediante un kit commerciale specifico per il DNA a doppio filamento: in presenza di biofilm opsonizzato i PMN rilasciano una quantità notevole di DNA rispetto al biofilm non opsonizzato che mostra dei valori simili a quelli ottenuti con i PMN da soli. Il trattamento con la DNasi ha determinato non solo una drastica diminuzione della quantità di DNA rilasciato da parte dei PMN (Figura 31), ma ha anche evidenziato un aspetto nuovo ed altamente interessante.

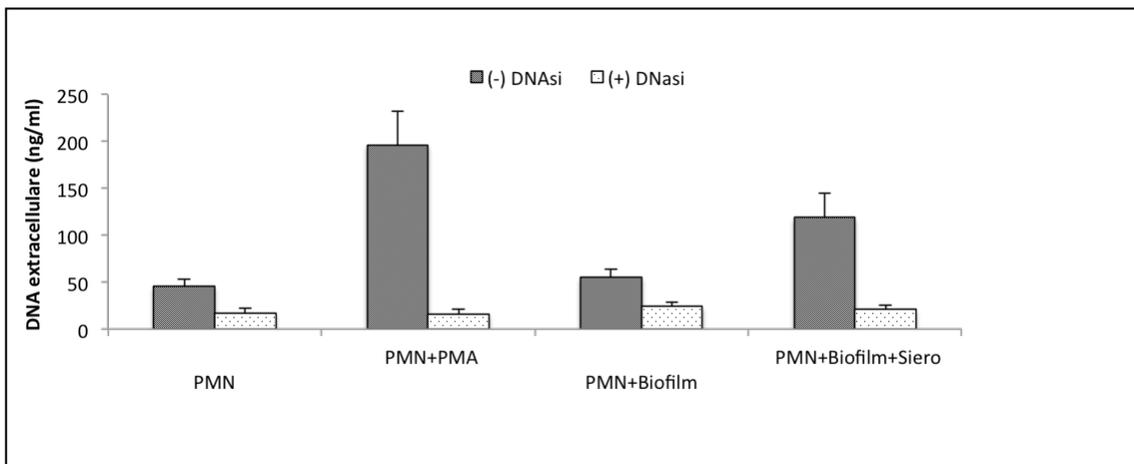


Figura 31: Rilascio del DNA da parte dei PMN da soli e dei PMN attivati con PMA, biofilm di *S. epidermidis* e biofilm opsonizzato di *S. epidermidis*. Il grafico mostra le medie e le deviazioni standard di 3 esperimenti effettuati in triplicato. I PMN sono stati isolati a partire da 3 donatori diversi.

La presenza dell'elastasi nelle NET sembra essere strettamente dipendente dalla contemporanea presenza del DNA: infatti il trattamento con la DNasi determina non solo la perdita dell'elastasi, ma anche della struttura tridimensionale delle NETs, il DNA pertanto potrebbe rappresentare l'impalcatura di queste trappole extracellulari e la sua presenza potrebbe quindi essere importante nell'attività delle NETs contro il biofilm batterico. Le NETs rappresentano delle ottime armi nella difesa contro il biofilm batterico, infatti le trappole sono in grado di limitare la diffusione batterica e quindi di confinare l'infezione.

4. CONCLUSIONI

Le infezioni legate agli impianti sono il tallone d'Achille dell'applicazione dei biomateriali in campo medico e rappresentano pertanto la causa principale del fallimento degli impianti protesici (Campoccia et al., 2006).

Lo studio dell'internalizzazione delle principali specie batteriche responsabili delle infezioni associate all'impianto negli osteoblasti ha consentito di studiare il ruolo del meccanismo invasivo nella patogenesi delle osteomieliti associate all'impianto, presupposto fondamentale per identificare la migliore terapia antibiotica da intraprendere nel corso di questo tipo di infezioni. L'ingresso di un patogeno in cellule eucariotiche che non sono peculiarmente fagociti professionali rappresenta un processo cruciale nella patogenesi delle malattie infettive, poiché consente di prevenire l'eliminazione del batterio da parte delle difese immunitarie dei tessuti e dell'organismo e di ostacolare l'azione della maggior parte degli antibiotici (che non penetrano e non agiscono su microrganismi intracellulari), così sostenendo ed alimentando l'infezione. L'internalizzazione rappresenta quindi per il batterio un'ottima strategia difensiva per eludere non solo la sorveglianza immunologica messa in atto dall'ospite, ma anche la terapia antibiotica, e per favorire la persistenza del microrganismo nell'ospite (Hauck and Ohlsen, 2006).

Il saggio di invasione messo a punto su micropiastra ha consentito di investigare in modo approfondito e dettagliato il ruolo ed il peso dell'internalizzazione nella patogenesi delle infezioni ortopediche peri-protesiche causate da *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis*.

Limitatamente agli isolati considerati nello studio si può affermare che l'invasione delle cellule MG-63 non rappresenta un meccanismo patogenetico alla base delle infezioni ortopediche associate all'impianto causate da *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis*, al contrario, in *S. aureus* la spiccata capacità invasiva rappresenta una abile

strategia patogenetica che consente al patogeno di sfuggire alla terapia sistemica e alla risposta immunitaria dell'ospite.

Il basso livello di internalizzazione osservato tra gli isolati clinici di *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* potrebbe essere semplicemente legato ad un fenomeno non specifico di invasione passiva all'interno degli osteoblasti. Pertanto gli isolati clinici di *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis*, considerati nello studio, si comporterebbero come microparticelle non vitali che aderiscono alla superficie esterna degli osteoblasti ma hanno una bassa probabilità di penetrarvi all'interno. Alla luce dei risultati ottenuti la terapia per le infezioni associate all'impianto causate da *S. aureus* dovrebbe prevedere l'uso di antibiotici permeabili alle cellule dell'ospite e pertanto attivi a livello intracellulare, al contrario nelle infezioni ortopediche causate da *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ed *E. faecalis* non risulterebbe essere necessario l'uso di antibiotici attivi nella cellula.

E' stato studiato inoltre il ruolo dell'immunità innata nella difesa contro il biofilm batterico. In seguito all'incubazione del biofilm opsonizzato di *S. epidermidis* con i PMN è stato possibile osservare la formazione delle NETs. Le NETs rappresentano delle ottime armi nella difesa contro il biofilm batterico, infatti le trappole sono in grado di limitare la diffusione batterica e quindi di confinare l'infezione (Arciola, 2010).

I neutrofili, attivati dal contatto con il biofilm opsonizzato, hanno rilasciato il DNA e l'elastasi, una potente proteina battericida. Il trattamento con la DNasi ha determinato non solo una drastica diminuzione della quantità di DNA rilasciato da parte dei PMN, ma ha anche evidenziato un aspetto nuovo ed altamente interessante. La presenza dell'elastasi nelle NET sembra essere strettamente dipendente dalla contemporanea presenza del DNA: infatti il trattamento con la DNasi determina non solo la perdita dell'elastasi, ma anche della struttura tridimensionale delle NETs, il DNA pertanto potrebbe rappresentare l'impalcatura di queste trappole extracellulari e la sua presenza potrebbe quindi essere importante nell'attività delle NETs contro il biofilm batterico.

La comprensione del ruolo dell'internalizzazione nella patogenesi delle osteomieliti associate all'impianto e lo studio della risposta immunitaria innata a questo tipo di infezioni spesso caratterizzate dalla presenza di biofilm, rappresentano i presupposti fondamentali per identificare e affinare le migliori strategie terapeutiche necessarie ad eradicare l'infezione.

5. BIBLIOGRAFIA

Aderem A, Underhill DM. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 17:593-623.

Agerer F, Michel A, Ohlsen K, Hauck CR. (2003). Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 278:42524-42531.

Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP. (2001). *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun.* 69:2872-2877.

Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Imamura K, Yamaguchi A, Sato K, Nagata N, Suds T. (1991). Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J Bone Miner Res.* 6:183-189.

Alexander EH, Bento JL, Hughes FM, Marriott I, Hudson I, Hudson MC, Bost KL. (2001). *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Dublin induce tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts. *Infect Immun.* 69(3):1581-1586.

Almeida RA, Oliver SP. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 31(5):205-12.

Anderson JM. Inflammation, wound healing, and the foreign-body response. (2004). In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine* Elsevier, San Diego, CA. pp 296-304.

Arciola CR. (2010). Host defense against implant infection: the ambivalent role of phagocytosis. *Int J Artif Organs.* 33(9):565-567.

Arciola CR, Alvi FI, An YH, Campoccia D, Montanaro L. (2005a). Implant infection and infection resistant materials: a mini review. *Int J Artif Organs.* 28(11):1119-25.

Arciola CR, An YU, Campoccia D, Donati ME, Montanaro L. (2005c). Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J Artif Organs.* 28:1091-1100.

Arciola CR, Baldassarri L, Campoccia D, Creti R, Pirini V, Huebner J, Montanaro L. (2008). Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*. 29(5):580-6.

Arciola CR, Bustanji Y, Conti M, Campoccia D, Baldassarri L, Samori B, Montanaro L. (2003). *Staphylococcus epidermidis*-fibronectin binding and its inhibition by heparin. *Biomaterials*. 24(18):3013-3019.

Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, Pirini V, Huebner J, Montanaro L. (2007). The role of *Enterococcus faecalis* in orthopaedic peri-implant infections demonstrated by automated ribotyping and cluster analysis. *Biomaterials*. 28(27):3987-95.

Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, Montanaro L. (2015). Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv Exp Med Biol*. 830:29-46.

Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. (2005d) Prevalence of *cna*, *fmbA* and *fmbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiol. Lett*. 246: 81-86.

Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, Speziale P, Montanaro L. (2005b). Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*. 26(33):6530-5.

Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Rizzi S, Donati ME, Baldassarri L, Montanaro L. (2004). Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials*. 25(18):4117-25.

Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. (2012a) Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 33:5967-82

Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L. (2005e) A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A*. 75(2):408-13.

Arciola CR, Hänsch GM, Visai L, Testoni F, Maurer S, Campoccia D, Selan L, Montanaro L. (2012b) Interactions of staphylococci with osteoblasts and phagocytes in

- the pathogenesis of implant-associated osteomyelitis. *Int J Artif Organs*. 35:713-26.
- Arciola CR, Montanaro L, Costerton JW. (2011a). New trends in diagnosis and control strategies for implant infections. *Int J Artif Organs*. 34(9):727-36.
- Arciola CR, Visai L, Testoni F, Arciola S, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L. (2011b). Concise survey of *Staphylococcus aureus* virulence factors that promote adhesion and damage to peri-implant tissues. *Int J Artif Organs*. 34:771-80.
- Arrecubieta C, Lee MH, Macey A, Foster TJ, Lowy FD. (2007). SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J Biol Chem*. 282(26):18757-18776.
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281:1305-1308
- Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J Biomed Mater Res*. (1984) 18(4):327-355.
- Banner MA, Cunniffe JG, Macintosh RL, Foster TJ, Rohde H, Mack D, Hoyes E, Derrick J, Upton M, Handley PS. (2007). Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J. Bacteriol*. 189:2793–2804.
- Beech IB, Sunner J, Arciola CR, Cristiani P. (2006). Microbially influenced corrosion: damage to prostheses, delight for bacteria. *Int J Artif Organs*. 29(4):443-452.
- Bertuccini L, Ammendolia MG, Superti F, Baldassarri L. (2002). Invasion of HeLa cells by *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Med Microbiol Immunol*. 191:25-31.
- Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC. (1999). *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis*. 180:1912-1920.
- Bourgeois I, Camiade E, Biswas R, Courtin P, Gibert L, Götz F, Chapot-Chartier MP, Pons JL, Pestel-Caron M. (1999). Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase activities. *FEMS Microbiol Lett*. (2009) 290(1):105-113.
- Bowden MG, Visai L, Longshaw CM, Holland KT, Speziale P, Hook M. (2002). Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J Biol Chem*. 277:43017-43023.

Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 52:13-22.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303(5663):1532-35.

Campoccia D, Baldassarri L, Pirini V, Ravaioli S, Montanaro L, Arciola CR. (2008). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* from implant orthopaedic infections: Ribotypes, *agr* polymorphism, leucocidal toxins and antibiotic resistance. *Biomaterials*. 29:4108-4116.

Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*. 34(34):8533-54.

Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. (2009a). Current methods for molecular epidemiology studies of implant infections. *Int J Artif Organs*. 32:642-54.

Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. (2006). The significance of infection related to orthopaedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*. 27:2331-39.

Campoccia D, Montanaro L, Pirini V, Ravaioli S, Arciola CR. (2009d) Prevalence of genes for aminoglycoside-modifying enzymes in *Staphylococcus epidermidis* isolates from orthopedic postsurgical and implant-related infections. *J Biomed Mater Res A*. 88(3):654-63.

Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. (2010). Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*. 31:6363-77.

Campoccia D, Montanaro L, von Eiff C, Pirini V, Ravaioli S, Becker K, Arciola CR. (2009c) Cluster analysis of ribotyping profiles of *Staphylococcus epidermidis* isolates recovered from foreign body-associated orthopedic infections. *J Biomed Mater Res A*. 88(3):664-72.

Campoccia D, Speziale P, Ravaioli S, Cangini I, Rindi S, Pirini V, Monanaro L, Arciola CR. (2009b) The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. *Biomaterials*. 30:6621-6628.

- Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician*. 63(12):2413-2420.
- Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, Kroll G, Schulze C, Buck F, Mack D, Aepfelbacher M, Rohde H. (2010). The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*. 75:187e207.
- Claro T, Widaa A, O'Seaghdha M, Miajlovic H, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. (2011). *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PloS One*. 6(4):e18748.
- Cohn ZA, Hirsch JG. (1960). The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 112: 1015-1022.
- Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ, Herr AB. (2008). A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(49):19456e61.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 41:435-64.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1978). How bacteria stick. *Sci Am*. 238:86-95.
- Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 28:1062-1068.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-22.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol*. 183:2888 –2896.
- Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S. (1995). Review: granulocyte colony-stimulating factor--role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis*. 172:1061-1075.
- De Wit D, Mulla R, Cowie MR, Mason JC, Davies KA. (1993). Vertebral osteomyelitis due to *Staphylococcus epidermidis*. *Br J Rheumatol*. 32:339-341

- DeLeo FR, Diep BA, Otto M. (2009). Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am.* 23(1):17-34
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smaywvsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the Unites States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 32:S114-132
- Donvito B, Etienne J, Denoroy L, Greenland T, Benito Y, Vandenesch F. (1997). Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect Immun.* 65:95-100
- Dziewanowska K, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA. (2000). Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun.* 68:6321-6328
- Edwards AM, Potts JR, Josefsson E, Massey RC. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* 6(6):e1000964
- Ehrlich GD, Arciola CR. (2012). From Koch's postulates to biofilm theory. The lesson of Bill Costerton. *Int J Artif Organs.* 35(10):695-9.
- Emmery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, Diprinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 273:14363-14367
- Emori TG, Gaynes RP. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 6:428-42
- Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. (2008). Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 32(1):23-37
- Finlay BB, Cossart P. (1997). Exploitation of mammalian host cells functions by bacterial pathogens. *Science.* 276: 718-725
- Forsgren A, Nordström K. (1974). Protein A from *Staphylococcus aureus*: the biological significance of its reaction with IgG. *Ann N Y Acad Sci.* 236(0):252-266

- Foster SJ. (1995). Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *J Bacteriol.* 177:5723-5725
- Foster TJ, Hook M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484-488
- Fournier B, Philpott DJ. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 18:521-540
- Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Hook M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 79:672-679
- Fraimow HS. (2009). Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis. *Semin Plast Surg.* 23:90-9
- Francois P, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP. (1996). Host-bacteria interactions in foreign body infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 17(8):514-520
- Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. (2008). From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin Microbiol Rev.* 21: 111-113
- Frenck RW, Sarman G, Harper TE, Buescher ES. (1990). The ability of recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to protect neonatal rats from septic death due to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 162:109-114
- Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, Nervi C, Fleurette J. (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 38:168-172
- Galdbart JO, Morvan A, Desplaces N, el Solh N. (1999). Phenotypic and genomic variation among *Staphylococcus epidermidis* strains infecting joint prostheses. *J Clin Microbiol.* 37:1306-1312
- Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O’Gara JP, Potts JR, Foster TJ. (2010b). Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192:5663–5673
- Geoghegan JA, Ganesh VK, Smeds E, Liang X, Hook M, Foster TJ. (2010a). Molecular characterization of the interaction of staphylococcal microbial surface components

recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with fibrinogen. *J Biol Chem.* 285:6208-6216

Geoghegan JA, Monk IR, O’Gara JP, Foster TJ. (2013). Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein A mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. *J. Bacteriol.* 195:2675–2683

Gerke C, Kraft A, Sassmuth R, Schweitzer O, Gotz F. (1998). Characterisation of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273:18586–18593

Gristina AG. (1987). Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 237:1588-95

Hamza T, Dietz M, Pham D, Clovis N, Danley S, Li B. (2013). Intra-cellular *Staphylococcus aureus* alone causes infection in vivo. *Eur Cell Mater.* 25:341-50

Hauck CR, Ohlsen K. (2006). Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 9(1):5-11

Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol.* 24:1013-1024

Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20:1083–1091

Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib A, Uekotter A, Peters G. (2003). Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 149:2769-2778

Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, Van Schaik W. (2009). LPXTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* 17:423-30

Hermann M, Vaudaux PE, Pitter D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Waldvogel FA. (1988). Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* 158: 693-701

Heubner J, Goldmann DA. (1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.* 50:223-236

Hirschhausen N, Schlesier T, Schmidt MA, Götz F, Peters G, Heilmann C. (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cell Microbiol.* 12:1746-1764

Holderbaum D, Spech T, Ehrhart LA, Keys T, Hall GS. (1987). Collagen binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 25:2258-2261

Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O’Gara JP. (2011). Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect. Immun.* 79:1153–1165

Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. (2001a). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol.* 183:6778-6786

Hussain M, Hagggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock JI, Sinha B. (2008). More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect Immun.* 76(12):5615-5623

Hussain M, Heilmann C, Peters G, Herrmann M. (2001b). Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog.* 31:261-270

Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perdreau-Remington F, Peters G. (1997). A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun.* 65:519-524

Hussain M, Schäfer D, Juuti KM, Peters G, Haslinger-Löffler B, Kuusela PI, Sinha B. (2009). Expression of Pls (Plasmin Sensitive) in *Staphylococcus aureus* negative for pls reduces adherence and cellular invasion and acts by steric hindrance. *J Infect Dis.* 200(1):107-117

Hussain M, Steinbacher T, Peters G, Heilmann C, Becker K. (2014). The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. *Int J Med Microbiol.* S1438-4221

Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T et al. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 145:3297-3303

Janzon L, Lofdahl S, Arvidson S. (1989). Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet.* 219:480-5

Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, Harris M, Henderson B, Bentley G, Meghji S. (1999). Mechanism of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun.* 67(5):2677-2681

Johnson GM, Lee DA, Regelman WE, Gray ED, Peters G, Quie PG. (1986). Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect Immun.* 54(1):13-20

Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, Lappin-Scott H. (2001). Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet.* 357:40-1

Joubert O, Voegelin J, Guillet V, Tranier S, Werner S, Colin DA, Dalla Serra M, Keller D, Monteil H, Mourey L, Prévost G. (2007). Distinction between pore assembly by staphylococcal alpha-toxin versus leukotoxins. *J Biomed Biotechnol.* (1):25935

Juuti KM, Sinha B, Werbeck C, Peters G, Kuusela PI. (2004). Reduced adherence and host cell invasion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing the surface protein Pls. *J Infect Dis.* 189:1574-1584

Kaneda T, Nojima T, Nakagawa M, Ogasawara H, Kaneko H, Sato T, Mano H, Kumegawa M, Hakeda Y. (2000). Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol.* 4254-4263

Kayser FH. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol.* 88:255-62

Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji A, Nair SP. (2007). Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect.* 9:460-465

Kintarak S, Whawell SA, Speight PM, Packer S, Nair SP. (2004). Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun.* 72:5668-5675

- Klenerman L. (2007). A history of osteomyelitis from the Journal of bone and joint surgery: 1948 TO 2006. *J Bone Joint Surg Br.* 89(5):667-70.
- Klotchko A, Wallace MR, Licitra C, Sieger B. (2011). *Staphylococcus lugdunensis*: an emerging pathogen. *South Med J.* 104(7):509-514
- Kobayashi Y, Mizoguchi T, Take I, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N. (2005). Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1. *J Biol Chem.* 280:11395-11403
- Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasaki A. (1991). Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med.* 173:1291-1294
- Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. (1992). Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun.* 60:25-30
- Kristian SA, Birkenstock TA, Sauder U, Mack D, Gotz F, Landmann R. (2008). Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis.* 197(7):1028-1035
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. (2008). A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PloS One.* 3(1):e1409
- Kumar JK. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. (2008). *Appl Microbiol Biotechnol.* 80(4):555-61
- Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. (2007). Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the united States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am.* 89:780-5
- Langone JJ. (1982). Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv Immunol.* 32:157-252
- Lee LY, Liang X, Hook M, Brown EL. (2004). Identification and characterization of C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem.* 279:50710-50716

- Legeay G, Poncin-Epaillard F, Arciola CR. (2006). New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no) bioadhesion. *Int J Artif Organs* 29(4):453e61
- Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. (2002). Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 70(11): 6339-6345.
- Lentino JR. (2003). Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis.* 36:1157-1161
- Lew DP, Waldvogel FA. (2004). Osteomyelitis. *Lancet.* 364:369-379
- Lew DP, Waldvogel FA. (1997). Osteomyelitis: current concepts. *N Engl J Med.* 336:999-1007
- Lewis K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemoter.* 55:165-99
- Li M, Cha DJ, Lai Y, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M. (2007). The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 66(5):1136-1147
- Li NH, Ouchi Y, Okamoto Y, Masuyama A, Kaneki M, Futami A, Hosoi T, Nakamura T, Orimo H. (1991). Effect of parathyroid hormone on release of interleukin 1 and interleukin 6 from cultured mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 179:236-242
- Liggett W, Shevde N, Anklesaria P, Sohoni S, Greenberger J, Glowacki J. (1993). Effects of macrophage colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on osteoclastic differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells.* 11:398-311
- Lindfors NC, Hyvönen O, Nyssönen M, Kirjavainen M, Kankare J, Gullichsen E, Salo J. (2010). Bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in treatment of osteomyelitis. *Bone.* 47:212-218
- Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Luscher C, Pataki A, Zak O, O'Reilly T. (1997). Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infect Immun.* 65:3438-3443
- Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 202(2):209-215

Lowik CW, van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA, Papapoulos SE. (1989). Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 162:1546-1552

Lowy FD. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339(8):520-532

Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR. (2012). A NET outcome. *Front Immunol.* 3:365

Maiello A, Spolaor D. Guida per l'incertezza di misura nelle prove microbiologiche. Pubblicata su web (<https://sites.google.com/site/incertezzamicro/home/guida>) Revisione 2, Gennaio 2011, pp 12

Massey RC, Kantzanou MN, Fowler T, Day NP, Schofield K, Wann ER, Berendt AR, Hook M, Peacock SJ. (2001). Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol.* 3:839-851

McCoy WF, Bryers JD, Robbins J, Costerton JW. (1981). Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol.* 27:910-7

McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Foster TJ. (1994). Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 11-237-248

Meghji S, Crean Sj, Hill PA, Sheikh M, Nair SP, Heron K, Henderson B, Mawer EB, Harris M. (1998). Surface-associated protein from *Staphylococcus aureus* stimulates osteoclastogenesis: possible role in *S. aureus*-induced bone pathology. *Br J Rheumatol.* 37:1095-1101

Meghji S, Crean SJ, Nair S, Wilson M, Poole S, Harris M, Henderson B. (1997). *Staphylococcus epidermidis* produces a cell-associated proteinaceous fraction which causes bone resorption by a prostanoid-independent mechanism: relevance to the treatment of infected orthopaedic implants. *Br J Rheumatol.* 36(9):957-963

Menzies BE, Kourteva I. (2000). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 29(1):39-45

Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I. (2009). Protein A mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191: 832– 843

Meyle E, Brenner-Weiss G, Obst U, Prior B, Hänsch GM. (2012). Immune defense against *S. epidermidis* biofilms: components of the extracellular polymeric substance activate distinct bactericidal mechanisms of phagocytic cells. *Int J Artif Organs*. 35(10):700-712.

Millán D, Chiriboga C, Patarroyo MA, Fontanilla MR. (2013). *Enterococcus faecalis* internalization in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Microb Pathog*. 57:62-9.

Mitchell J, Tristan A, Foster TJ. (2004). Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology*. 150:3831-3841.

Modrowski D, Lomri A, Marie PJ. (1997). Endogenous GM-CSF is involved as an autocrine growth factor for human osteoblastic cells. *J Cell Physiol*. 170:35-46.

Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L, Borsetti E. (1999). Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials*. 20:1945-1949.

Montanaro L, Campoccia D, Arciola CR. (2007). Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials*. 28:5155-68.

Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, Arciola CR. (2011c). Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs*. 34(9):824-31.

Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietracola G, Giannini S, Arciola CR. (2011b). Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol*. 6:1329-49.

Montanaro L, Testoni F, Poggi A, Visai L, Speziale P, Arciola CR. (2011a). Emerging pathogenetic mechanisms of the implant-related osteomyelitis by *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs*. 34:781-8.

Montonen M, Li TF, Lukinmaa PL, Sakai E, Hukkanen M, Sukura A, Kontinen YT. (2006). RANKL and cathepsin K in diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. *J Oral Pathol Med*. 35:620-625.

Moreillon P, Que YA, Glauser MP. (2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal toxic shock). In Mandell GL, Bennett JE and Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious disease*. 6th ed, Churchill Livingstone, New York. pp. 2321-2351.

Myrvik QN, Wagner W, Barth E, Wood P, Gristina AG. (1989). Effects of extracellular slime produced by *Staphylococcus epidermidis* on oxidative responses of rabbit alveolar macrophages. *J Invest Surg.* 2(4):381-389.

Nair S, Song Y, Meghji, Reddi K, Harris M, Ross A, Poole S, Wilson M, Henderson B. (1995). Surface-associated proteins from *Staphylococcus aureus* demonstrate potent bone resorbing activity. *J Bone Miner Res.* 10:726-734.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Nugent I, Ross A, Ismael A, Bhudia NK, Harris M, Henderson B. (1997). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* have osteolytic surface proteins and a proportion of the population have antibodies that block this activity: is this of prognostic significance? *Br J Rheumatol.* 36:328-332.

Noble MA, Reid PE, Park CM, Chan VY. (1986). Inhibition of human neutrophil bacteriocidal activity by extracellular substance from slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 4(4):335-339.

Noore J, Noore A, Li B. (2013). Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra- and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(3):1283-90.

Nuzzo I, Sanges MR, Folgore A, Carratelli CR. (2000). Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 27(3):235-240.

O’Gara JP, Humphreys H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* 50:582–587.

O’Gara JP. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 270:179-88.

O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O’Gara JP. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and Fn-BPB. *J. Bacteriol.* 190:3835–3850.

O’Riordan K, Lee JC. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 17(1):218-234.

O’Toole G, Kaplan H, Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54:49-79.

Otto M. Staphylococcal biofilms. (2008). *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:207-228.

Palma M, Hagggar A, Flock JI. (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol.* 181:2840-2845.

Park PW, Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham RP. (1996). Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 271:15803-15809.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganism to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585-617.

Patti JM, Boles JO, Höök M. (1993). Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.* 32(42):11428-11435.

Patti JM, Höök M. (1994). Microbial adhesions recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol.* 6(5):752-758.

Peacock SJ, Day NP, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. (2000). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect.* 41:23-31.

Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP. (2002). Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 70:4987-4996.

Pietracola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, Speziale P. (2011). Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs.* 34(9):799-810.

Pivrotto LA, Cissel DS, Keeting PE. (1995). Sex hormones mediate interleukin-1 beta production by human osteoblastic HOBIT cells. *Mol Cell Endocrinol.* 111:67-74.

Ponnuraj K, Bowden MG, Davis S, Gurusiddappa S, Moore D, Choe D, Xu Y, Hook M, Narayana SV. (2003). A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell.* 115(2):217-228.

Potter A, Ceotto H, Giambiagi-Demarval M, dos Santos KR, Nes IF, Bastos Mdo C. (2009). The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. *J Microbiol.* 47:319e26.

Ravaioli S, Selan L, Visai L, Pirini V, Campoccia D, Maso A, Speziale P, Montanaro L, Arciola CR. (2012). *Staphylococcus lugdunensis*, an aggressive coagulase-negative pathogen not to be underestimated. *Int J Artif Organs*. 35:742-53.

Rodgers J, Phillips F, Olliff C. (1994). The effects of extracellular slime from *Staphylococcus epidermidis* on phagocytic ingestion and killing. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 9(2):109-115.

Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D. (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*. 28:1711e20.

Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol*. 55:1883–1895.

Rohde H, Mack D, Christner M, Burdelski C, Franke G, Knobloch JKM. (2006). Pathogenesis of staphylococcal device related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev. Med. Microbiol*. 17: 45–54.

Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, van Wamel WJ, van Kessel KP, van Strijp JA. (2005). Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol*. 6(9):920-927.

Ruoslahti E, Piershbacher MD. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 238:491-7.

Ruoslahti E. (1991). Integrins as receptors for extracellular matrix, in *Cell biology of extracellular matrix*. (Hay ED, ed) 2^a ed., pp. 343-363, Plenum Press, New York.

Rupp ME, Fey PD, Heilmann C and Gotz F. (2001). Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis*. 183:1038-1042.

Ryden C, Maxe I, Franzen A, Ljungh A, Heinegard D, Rubin K. (1987). Selective binding of bone matrix sialoprotein to *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. *Lancet*. 2:515.

Ryding U, Flock JI, Flock M, Soderquist B, Christensson B. (1997). Expression of

collagen-binding protein and type 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 176:1096-1099.

Sax H, Lew D. (1991). Osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep.* 1:261–266.

Schlievert PM, Chuang-Smith ON, Peterson ML, Cook LC, Dunny GM. (2010). *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PLoS One.* 5:e13194.

Schroeder K, Jularic M, Horsburgh SM, Hirschhausen N, Neumann C, Bertling A, Schulte A, Foster S, Kehrel BE, Peters G, Heilmann C. (2009). Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS One.* 4:e7567.

Schwarz-Linek U, Hook M, Potts JR. (2004). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol.* 52:631-641.

Sendi P, Procton RA. (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* 17:54-58.

Shahrooei M, Hira V, Stijlemans B, Merckx R, Hermans PW, Van Eldere J. (2009). Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by rabbit polyclonal antibodies against the SesC protein. *Infect. Immun.* 77:3670–3678.

Shanbhag A, Yang J, Lilien J, Black J. (1992). Decreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene *in vitro*. *J Biomed Mater Res.* 26(2):185-195.

Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk M, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J, Potempa J. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12):4673-4679.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Benett L, Boone T, Shimamoto G, Derosé M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw.Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Cambell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 89:309-319.

Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Hermann M. (2000). Heterologously expressed *Staphylococcus aureus*

fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun.* 68:6871-6878.

Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Hermann M, Krause KH. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell Microbiol.* 1:101-117.

Sinha B, Fraunholz M. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol.* 300:170-175.

Somayaji SN, Ritchie S, Sahraei M, Marriott I, Hudson MC. (2008). *Staphylococcus aureus* induces expression of receptor activator of NF-kappaB ligand and prostaglandin E2 in infected murine osteoblasts. *Infect Immun.* 76(11):5120-5126.

Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, Visai L, Arciola CR. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* 4: 1337e52.

Stewart PS, Costerton JW. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358:135.

Stuart LM, Ezekowitz RAB. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 22:539-550.

Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K. (2004). Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol.* 172:2504-2510.

Szabados F, Marlinghaus L, Korte M, Neumann S, Kaase M, Gatermann SG. (2011). Fbl is not involved in the invasion of eukaryotic epithelial and endothelial cells by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 324(1):48-55.

Takamatsu Y, Simmons PJ, Moore RJ, Morris HA, To LB, Levesque JP. (1998). Osteoclast-mediated bone resorption is stimulated during short-term administration of granulocyte colony-stimulating factor but is not responsible for hematopoietic progenitor cell mobilization. *Blood.* 92:3465-3473.

- Testoni F, Montanaro L, Poggi A, Visai L, Campoccia D, Arciola CR. (2011). Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int J Artif Organs*. 34(9):789-798.
- Thomas MG, Peacock S, Daenke S, Berendt AR. (1999). Adhesion of *Staphylococcus aureus* to collagen is not a major virulence determinant for septic arthritis, osteomyelitis, or endocarditis. *J Infect Dis*. 179:291-293.
- Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, Pier GB. (1988). Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*. 157:713-722.
- Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. (2005). Bap dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*. 151:2465e75.
- Trampuz A, Zimmerli W. (2005). Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*. 135:243-51.
- Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, Von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B. (2010). *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis*. 202:1031-1040.
- Tucker KA, Reilly SS, Leslie CS, Hudson MC. (2000). Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol Lett*. 186(2):151-156.
- Uçkay I, Lübbecke A, Emonet S, Tovmirzaeva L, Stern R, Ferry T, Assal M, Bernard L, Lew D, Hoffmeyer P. (2009). Low incidence of hematogenous seeding to total hip and knee prostheses in patients with remote infections. *J Infect*. 59:337-45.
- Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT. (1997). Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med*. 185:1005-1012.
- Underhill DM, Ozinsky A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 20:825-852.
- Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, Tigaud S, Vandenesch F, Etienne J, Ferry T, Laurent F, Lyon BJI Study. (2013). *Staphylococcus*

epidermidis in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. PLoS One. 8:e67240.

Van Leeuwenhoek A. (1684). Microscopical observations about animals in the scurf of the teeth. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 14:568-74.

Vaudaux PE, François P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, Lew DP, Wabers H, Cooper SL. (1995). Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. Infect. Immun. 63:585–590.

Verhoef J. (1991). The phagocytic process and the role of complement in host defense. J Chemother. (Suppl 1):93-97.

Von Eiff C, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. (2006a). Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. Int J Artif Organs. 29:360-7.

Von Eiff C, Peters G, Becker K. (2006b). The small colony variant (SCV) concept – the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. Injury. 37(Suppl. 2):S26-33.

Vuong C, Durr M., Camody A.B., Peschel A., Klebanoff S.J., Otto M. (2004b). Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. Cell. Microbiol. 6:753–759.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M. (2004a). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J Biol Chem. 279(52):54881-54886.

Wada T, Nakashina T, Hiroshi N, Penninger JM. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 12:17-25.

Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. (1970). Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects (first of three parts). N Engl J Med. 282:198-206.

Watanabe I, Ichiki M, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. (2007). TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. J Immunol. 178(8):4917-4925.

- Weir EC, Horowitz MC, Baron R, Centrella M, Kacinski BM, Insogna KL. (1993). Macrophage colony-stimulating factor release and receptor expression in bone cells. *J Bone Miner Res.* 8:1507-1518.
- Wells CL, Moore EA, Hoag JA, Hirth H, Dunny GM, Erlandsen SL. (2000). Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun.* 68:7190-4.
- Wesson CA, Deringer J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, Trumble WR. (2000). Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspase 8 and 3. *Infect Immun.* 68(5):2998-3001.
- Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ and Nair SP. (2002). Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 70:6805-6810.
- Wilson CB, Jacobs RF, Smith AL. (1982). Cellular antibiotic pharmacology. *Semin Perinatol.* 6:205-13.
- Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. (2003). Lysozyme disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(11):3407-14.
- Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. (1982). Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis.* 146(4): 487-497
- Zimmerli W, Zarth A, Gratwohl A, Speck B. (1991). Neutrophil function and pyogenic infections in bone marrow transplant recipients. *Blood.* 77:393-399.