

## Società Medico Chirurgica di Ferrara

Sabato 05 Novembre 2016

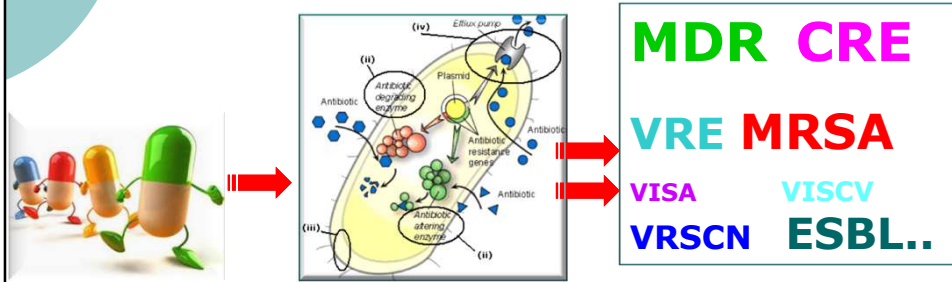
Aula Magna Nuovo Arcispedale S. Anna Cona, Ferrara

### L'Antibiotico-resistenza dei batteri Un problema da risolvere

## Le basi microbiologiche dell'antibiotico resistenza

**M.Rita Rossi**

UO Semplice di Microbiologia e Sierologia Laboratorio Unico Provinciale  
AOU S. Anna Ferrara



## Premessa



- Gli antibiotici hanno trasformato la pratica della medicina, rendendo facilmente **curabili infezioni una volta letali** e rendendo possibili altri progressi in campo medico, come chemioterapia e trapianto di organo
- Il precoce trattamento antibiotico per curare le infezioni ha dimostrato di **ridurre la morbilità e salvare vite umane**, un valido esempio è la tempestiva somministrazione di antibiotici nella gestione delle sepsi
- Tuttavia, il **20-50%** di tutti gli antibiotici prescritti in ospedali degli Stati Uniti per acuti sono **o inutili o inappropriati**
- Come tutti i farmaci, gli antibiotici hanno gravi effetti collaterali, tra cui **reazioni avverse al farmaco e l'infezione da Clostridium difficile (CDI)**
- I pazienti che sono inutilmente esposti agli antibiotici sono messi a rischio di gravi eventi avversi senza alcun beneficio clinico
- **L'abuso** di antibiotici ha contribuito al crescente problema della **resistenza agli antibiotici**, che è diventato una delle più gravi e crescenti **minacce alla salute pubblica**
- A differenza di altri farmaci, **la potenziale diffusione di organismi resistenti** significa che **l'abuso di antibiotici può impattare negativamente sulla salute dei soggetti non direttamente esposti**

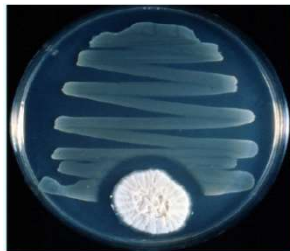
Core Elements of Antibiotic Stewardship Programs CDC (<http://www.cdc.gov>)

## La resistenza agli antibatterici

---

La resistenza non è semplicemente una conseguenza dell'uso degli antimicrobici ma parte integrante delle difese dei batteri che indica

**l'abilità di sopravvivere  
in un ambiente ostile**



Penicillina

1928: scoperta

Alexander Fleming

Premio: 1945



## I Microrganismi

### in natura producono antibiotici



oLa penicillina è stata scoperta da **Alexander Fleming** nel 1928 quando lo sviluppo di una coltura di stafilococchi su di una capsula Petri fu inibito da una coltura contaminante di una muffa, il *Penicillium notatum*.

oDurante la seconda guerra mondiale la forte richiesta di chemioterapici portò allo sviluppo di processi produttivi per la penicillina e segnò l'inizio **dell'era degli antibiotici** dando vita ad una vasta area della **microbiologia industriale**

## I Microrganismi

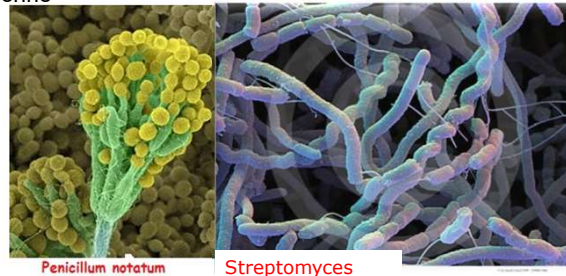
### che producono antibiotici

- o Tutti vivono nel terreno
- o Tutti sporulano o formano strutture di quiescenza
- o Sono *resistenti all'antibiotico prodotto*
- o **Perché producono antibiotici?**
  - **Vantaggio nutrizionale**
  - Segnale associato con la sporulazione e la quiescenza
  - **Possibilità di sopravvivere e riprodursi e passare la resistenza alla progenie o ad altri batteri non imparentati**

## Microrganismi per produrre antibiotici

Quasi tutti gli antibiotici sono prodotti naturali o i loro derivati sintetici

- **Batteri non filamentosi (Bacillus)(12%)**
  - Polymixina, bacitracina
- **Batteri filamentosi (Streptomyces) (66%)**
  - Tetraciclina, Streptomicina, aureomicina, eritromicina, cloramfenicolo, rifamicine
- **Funghi (Penicillium, Saccharomyces, Cephalosporium) (22%)**
  - Penicillina, cefalosporine



Molecular Biology of Antibiotic Production in Bacillus  
Crit Rev Technol Volume 10, 1990 - Issue 3  
Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic resistant bacteria  
EurAsian Journal of BioSciences  
EurAsia J BioSci 2, 73-82 (2008)

## Origini della resistenza agli antibiotici

- E' un passaggio naturale del processo evolutivo: **selezione naturale su predisposizione genetica**
- D'Costa e colleghi hanno isolato geni per la resistenza ai più comuni antibiotici «moderni» in sedimenti di permafrost **vecchi di 30.000 anni** nel sito di Lechuguilla Cave in New Mexico, in un'area rimasta isolata per più di 4 milioni di anni.

*Antibiotic resistance is ancient* [Nature](#). 2011 Aug 31;477(7365):457-61. doi: 10.1038/nature10388.

## Resistenza naturale agli antibiotici

Table 1. Intrinsic resistance in Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae are also intrinsically resistant to benzylpenicillin, glycopeptides, fusidic acid, macrolides (with some exceptions<sup>1</sup>), lincosamides, streptogramins, rifampicin, daptomycin and linezolid.

Rule no.	Organisms	Ampicillin	Aminocyclitol- Carbonyl- acid	Ampicillin-subactam	Ticarcillin	Cefazolin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefadroxil	Cefoxitin <sup>2</sup>	Cefuroxime	Tetracyclines	Tigecycline	Polymyxin B, Colistin	Nitrofurantoin
1.1	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> <sup>3</sup>	R			R							
1.2	<i>Citrobacter freundii</i> <sup>4</sup>	R	R	R		R	R					
1.3	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	R	R	R		R	R					
1.4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R		R	R					
1.5	<i>Escherichia hermannii</i>	R			R							
1.6	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R		R	R					
1.7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R			R							
1.8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R			R							
1.9	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R		R			R	R	R	R
1.10	<i>Proteus mirabilis</i>								R	R	R	R
1.11	<i>Proteus penneri</i>	R				R	R	R	R	R	R	R
1.12	<i>Proteus vulgaris</i>	R				R	R	R	R	R	R	R
1.13	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R
1.14	<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R
1.15	<i>Raoultella</i> spp.	R			R							
1.16	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R		R	R	R	R <sup>5</sup>		R	R
1.17	<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R		R	R					
1.18	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>											R

<sup>2</sup>R = resistant

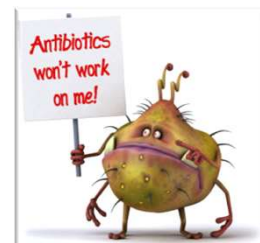
<sup>1</sup> Azithromycin is effective *in vivo* for the treatment of typhoid fever and erythromycin may be used to treat travellers' diarrhoea.

EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes, Expert Rules version 3.1 26 September 2016

Page 4 of 11

Specie batteriche  
costituzionalmente  
resistenti verso un  
determinato  
antibiotico

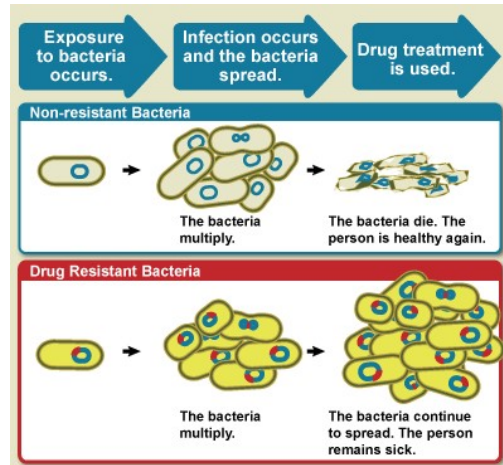
## Microrganismi che acquisiscono la resistenza verso uno o più antibiotici



## Resistenza acquisita

### ○ Pressione Selettiva

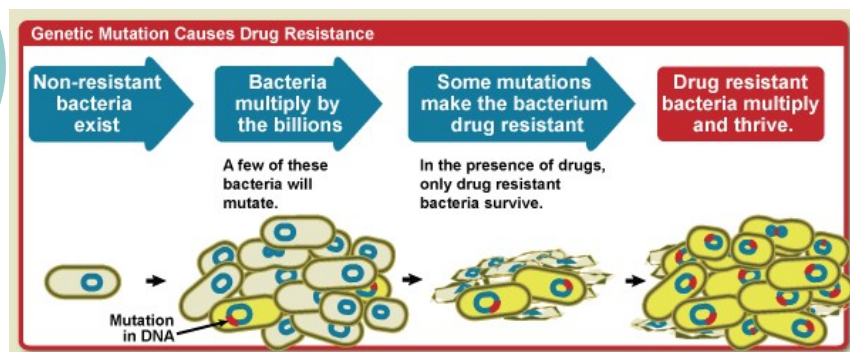
- **In presenza di un antibiotico**, i batteri sensibili muoiono, solo chi possiede un gene di resistenza sopravvive.
- **Chi sopravvive si riproduce** e la sua progenie rapidamente può diventare dominante su tutta la popolazione batterica



[www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobial/resistance](http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobial/resistance)

## Resistenza acquisita: Mutazione

cambiamento nel DNA che comporta modifica o sostituzione del target

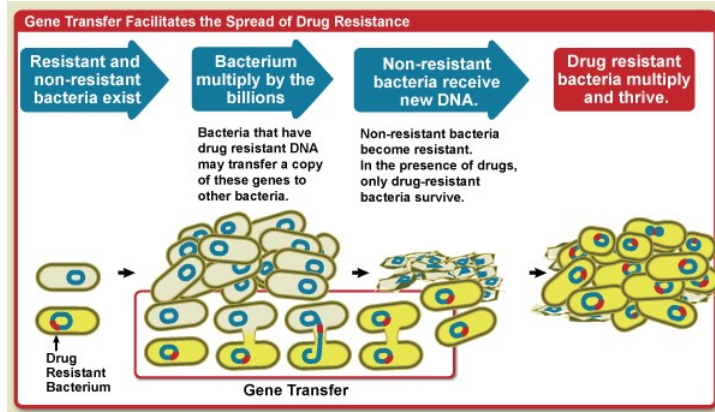


I batteri si moltiplicano in modo esponenziale (miliardi).

Alcuni di questi **mutano spontaneamente**. Qualche mutazione conferisce al batterio resistenza all'antibiotico. In presenza di antibiotico, solo il batterio resistente sopravvive. I batteri resistenti si moltiplicano e prosperano.

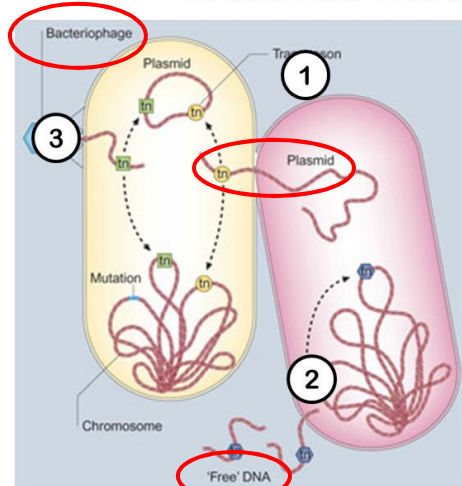
## Resistenza acquisita: Trasferimento di Geni

attraverso coniugazione, trasformazione molecole di DNA provenienti da cellule lisate vengono acquisite dai batteri direttamente dall'ambiente extracellulare o trasduzione per mezzo di virus



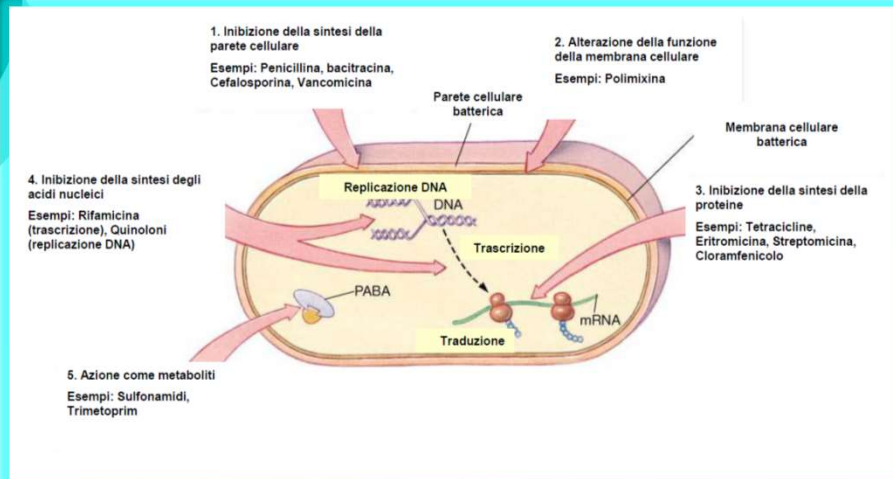
I batteri che possiedono geni di resistenza sul DNA possono **trasferire una copia di questi geni ad altri batteri**. I batteri non resistenti che ricevono il nuovo DNA diventano resistenti all'antibiotico. In presenza di antibiotico, solo il batterio resistente sopravvive. I batteri resistenti si moltiplicano e prosperano.

## MECCANISMI DI TRASMISSIONE DELLA RESISTENZA NEI BATTERI

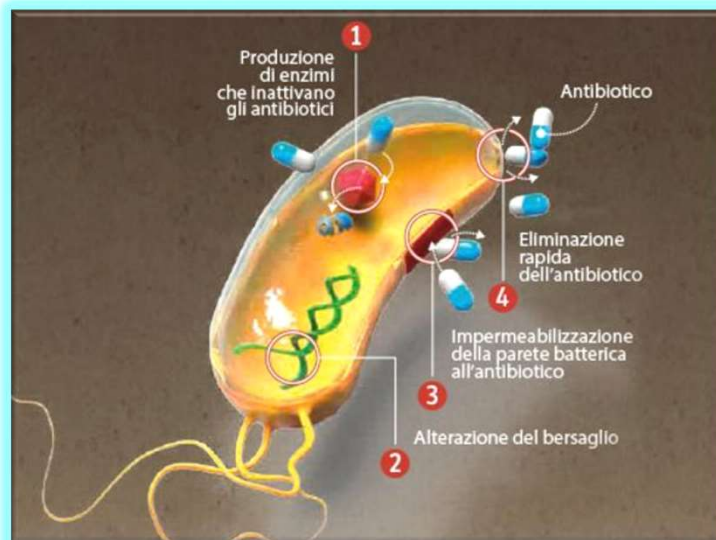


- 1 CONIUGAZIONE
- 2 TRASFORMAZIONE
- 3 TRASDUZIONE

## Bersagli degli antibiotici

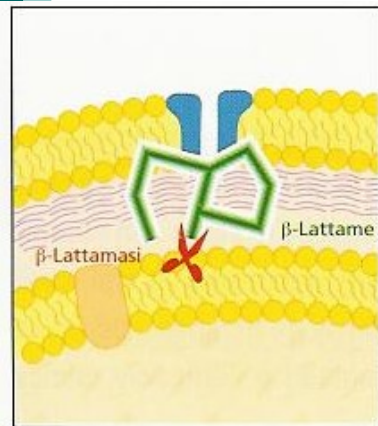


## Meccanismi biochimici di resistenza agli antibiotici





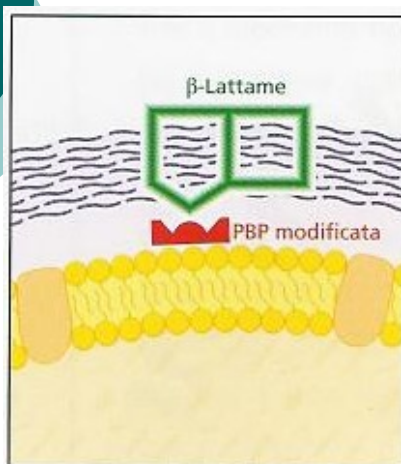
## Meccanismo biochimico della resistenza produzione di enzimi



- una produzione batterica di **enzimi** che inattiva l'antibiotico

Esempio:  
Penicillinasi degli Stafilococchi,  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) degli Enterobatteri

## Meccanismo biochimico della resistenza alterazione del bersaglio

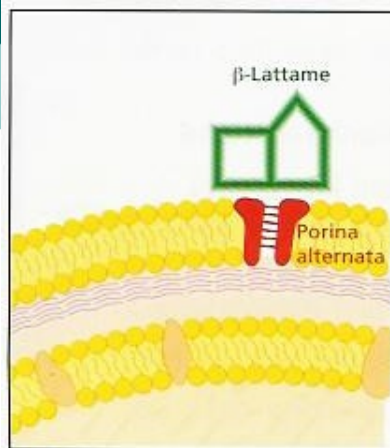


- **una modifica del target dell'antibiotico**

Esempio:  
Modifica delle Proteine di legame alla Penicillina (PBP) degli:  
- Stafilococchi resistenti all'oxacillina (detti stafilococchi "MRSA").  
- Pneumococchi resistenti alla penicillina

\* *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina

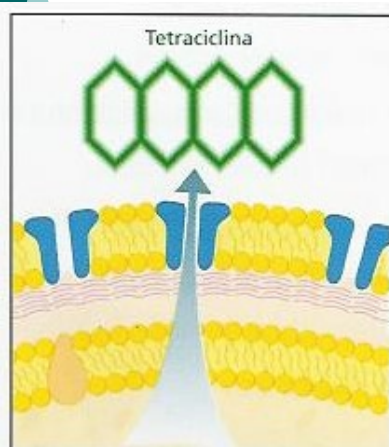
## Meccanismo biochimico della resistenza impermeabilità di membrana



- **una impermeabilità della membrana batterica** per alterazione o diminuzione quantitativa delle porine.

Esempio:  
*Pseudomonas aeruginosa* resistente all'imipenem

## Meccanismo biochimico della resistenza efflusso



- **un meccanismo di efflusso:** espulsione della molecola per trasporto attivo.

Esempio:  
Stafilococchi resistenti alle tetracicline

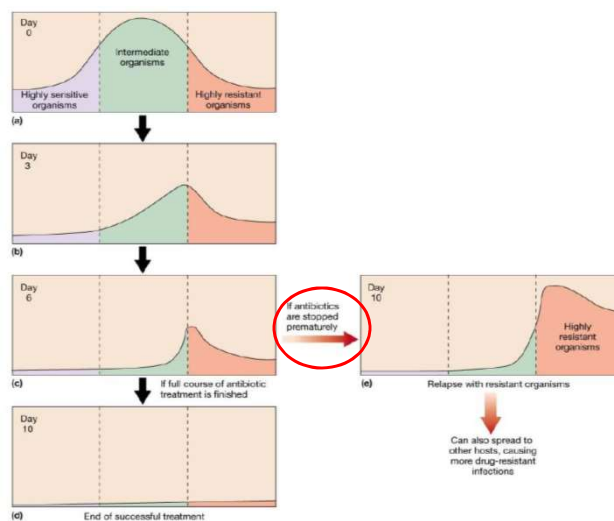
## E' possibile il recupero della sensibilità?



- Lo sviluppo di resistenza **costa al batterio** in termini di benessere «**fitness cost**»
  - I batteri resistenti crescono più lentamente
  - La replicazione di ulteriori plasmidi di DNA costa
  - Le mutazioni ribosomiali che conferiscono resistenza, riducono la sintesi di proteine
- **L'entità del fitness cost** è il principale parametro biologico che influenza la quota di sviluppo, la stabilizzazione e la **possibile reversione della resistenza nel tempo**
- Il **fitness cost** della resistenza permetterà a **batteri suscettibili di competere con i batteri resistenti** se la pressione selettiva dovuta agli antibiotici si riduce
- Esperimenti dimostrano che i batteri sviluppano rapidamente **mutazioni compensatorie** che riducono il **fitness cost** della resistenza **piuttosto che perdere la resistenza**
- Risultati sconcertanti suggeriscono che una volta selezionato, un ceppo resistente **esisterà per sempre**

Nature Reviews Microbiology 8, 260-271 2010

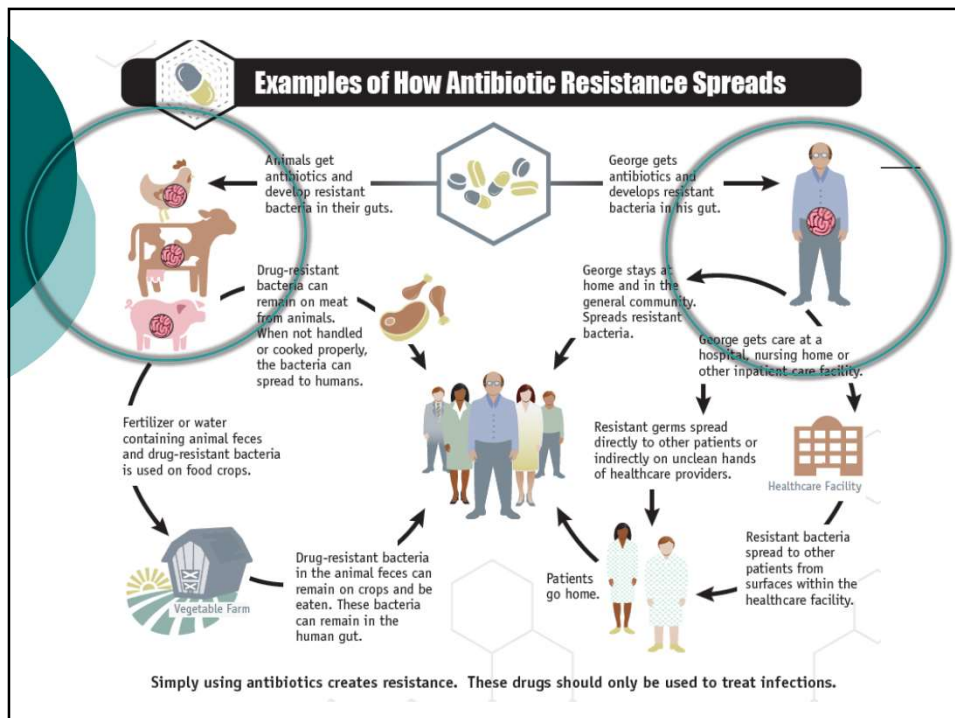
## Dinamica della resistenza



## L'utilizzo massivo o incongruo degli antibiotici nell'uomo, negli animali e in agricoltura



determina una **forte pressione selettiva** e fa emergere microrganismi farmaco-resistenti

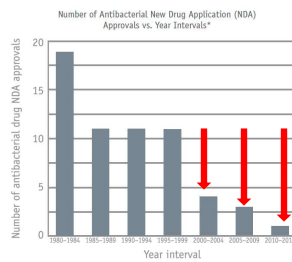




## Antibiotici, una risorsa limitata

### Tomorrow's Antibiotics: The Drug Pipeline

The number of new antibiotics developed and approved has steadily decreased in the past three decades, leaving fewer options to treat resistant bacteria.



\*Intervals from 1980-2009 are 5-year intervals; 2010-2012 is a 3-year interval. Drugs are linked to systemic agents. Data courtesy of FDA's Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

### Developing Resistance

Timeline of Key Antibiotic Resistance Events

Dates are based upon early reports of resistance in the literature. In the case of pan drug-resistant (PDR)-Acinetobacter and Pseudomonas, the date is based upon reports of healthcare transmission or outbreaks. Note: penicillin was in limited use prior to widespread population usage in 1943.


ANTIBIOTIC RESISTANCE IDENTIFIED	ANTIBIOTIC INTRODUCED
penicillin-R Staphylococcus 1940	1943 penicillin
	1950 tetracycline
	1953 erythromycin
tetracycline-R Shigella 1959	
methicillin-R Staphylococcus 1962	1960 methicillin
penicillin-R pneumococcus 1965	
erythromycin-R Streptococcus 1968	1967 gentamicin
	1972 vancomycin
gentamicin-R Enterococcus 1979	
ceftazidime-R Enterobacteriaceae 1987	1985 imipenem and ceftazidime
vancomycin-R Enterococcus 1988	
levofloxacin-R pneumococcus 1996	1996 levofloxacin
imipenem-R Enterobacteriaceae 1998	
XDR tuberculosis 2000	2000 linezolid
linezolid-R Staphylococcus 2001	
vancomycin-R Staphylococcus 2002	
PDR-Acinetobacter and Pseudomonas 2004/5	2003 daptomycin
ceftriaxone-R Neisseria gonorrhoeae PDR-Enterobacteriaceae 2009	
	2010 ceftaroline
ceftaroline-R Staphylococcus 2011	

## Strategie chiave necessarie per affrontare il problema della resistenza agli antibiotici





1. Prevenire le infezioni e prevenire la diffusione della resistenza
2. Monitorare i germi resistenti
3. Migliorare l'uso degli antibiotici disponibili
4. Promuovere lo sviluppo di nuovi antibiotici e lo sviluppo di nuovi test diagnostici per batteri resistenti

**ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS**  
in the United States, 2013



**ANTIBIOTIC STEWARDSHIP**  
IN YOUR FACILITY WILL

	<b>DECREASE</b>	<b>INCREASE</b>	
	■ ANTIBIOTIC RESISTANCE	■ GOOD PATIENT OUTCOMES	
	■ C. DIFFICILE INFECTIONS		
	■ COSTS		

***Grazie a tutti per  
l'attenzione!***



Breakpoint: **MicS** indica il “Limite di sensibilità” e **MicR** indica il “Limite di resistenza”.

**Come interpretare l'antibiogramma:**

se nel referto sono presenti più antibiotici con **valori di MIC preceduti dal segno <=** significa che la crescita del microorganismo è stata inibita dalla più bassa concentrazione dell'antibiotico testata, pertanto sono da considerare **parimenti sensibili indipendentemente dal valore numerico**.

un valore di MIC **non** preceduto da un segno deve essere considerato in relazione alla sua **distanza dal “Limite di sensibilità”**

Esempio

la MIC dell'antibiotico X è 16 e il limite di sensibilità è 128  
la MIC dell'antibiotico Y è 1 e il limite di sensibilità è 2

**il microorganismo deve essere considerato più sensibile a X che a Y** (perchè X è più distante dal breakpoint)

Staphylococcus aureus		MIC	MicS	MicR
Penicillina G	R	>=0,5	<= 0,125	> 0,125
cefotaxim screen	-	Neg		
Clindamicina	S	0,25	<= 0,25	> 0,5
Eritromicina	S	0,5	<= 1	> 2
Acido Fusidico	S	<=0,5	<= 1	> 1
Gentamicina	S	<=0,5	<= 1	> 1
Levofloxacina	S	0,25	<= 1	> 2
Linezolid	S	2	<= 4	> 4
Oxacillina MIC	S	<=0,25	<= 2	> 2
Rifampicina	S	<=0,03	<= 0,06	> 0,5
Teicoplanina	S	<=0,5	<= 2	> 2
Tigecyclina	S	<=0,12	<= 0,5	> 0,5
Daptomicina	S	0,25	<= 1	> 1
Trimetoprim/Sulfam.	S	<=10	<= 40	> 80
Vancomicina	S	<=0,5	<= 2	> 2
Tetraciclina	S	<=1	<= 1	> 2

## Interpretazione della MIC

- Valori preceduti dal segno **<=** indicano che la crescita è stata inibita dalla più bassa concentrazione dell'antibiotico utilizzata per il test in vitro
- Se nel referto sono presenti più antibiotici con valori di MIC preceduti dal segno **<= sono da considerare parimenti sensibili indipendentemente dal valore numerico.**
- Esempio
  - La MIC dell'antibiotico X è **<=8**
  - La MIC dell'antibiotico Y è **<=0.5**

**il microorganismo si è dimostrato tanto sensibile a X quanto ad Y**

## Interpretazione della MIC

---

- Un valore **non** preceduto da un segno deve essere considerato in relazione alla sua **distanza dal valore di breakpoint** tra le categorie S e quelle I o R (Limite di sensibilità) tenendo presente che vengono testate concentrazioni al raddoppio.
- Esempio
  - La MIC dell'antibiotico X è 16 e il breakpoint 128
  - e la Mic dell'antibiotico Y è 1 e il breakpoint 2

**il microrganismo deve essere considerato più sensibile a X che a Y** (x' è più distante dal breakpoint)