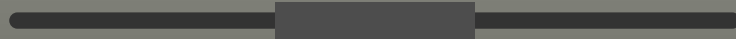


MECCANISMI DI AZIONE E DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI



Studio dell'efficacia degli antibiotici

- ✓ Uno dei test più importanti che viene comunemente eseguito nel laboratorio di microbiologia clinica è la **determinazione dell'efficacia antimicrobica** di un farmaco nei confronti di specifici patogeni
 - ✓ Nella pratica clinica questo tipo di test, essenziale per una **corretta terapia**, permette di vedere quali siano i farmaci più efficaci nei confronti di un certo microrganismo patogeno
 - ✓ Fornisce, inoltre, una stima della **dose terapeutica** più opportuna per la cura della malattia infettiva.
-

Test per la determinazione della sensibilità batterica ai farmaci antibatterici

Le tecniche per eseguire questo tipo di test sono sostanzialmente riconducibili a due metodi principali:

1. **ANTIBIOGRAMMA O KIRBY BAUER** > Metodo della diffusione in agar
2. **MIC (Minime Concentrazioni Inibenti)**
 - Metodo delle diluizioni scalari in brodo
 - Metodo epsilometrico in agar: **E-test**

Interpretazione dei risultati mediante linee guida internazionali

- ❑ ***EUCAST*** (Europa)

European Committee on Antimicrobial
Susceptibility Testing

- ❑ ***CLSI*** (Stati Uniti)

Clinical & Laboratory Standards Institute

ANTIBIOGRAMMA O METODO DI KIRBY BAUER

- È un metodo qualitativo (quali-quantitativo), semplice, rapido ed economico, valido per microrganismi aerobi a crescita rapida.
 - È il procedimento più comunemente usato in laboratorio, e permette di ottenere una determinazione dell'efficacia antimicrobica e una valutazione dei livelli di **resistenza = R** o **sensibilità = S**
 - Sviluppato agli inizi degli anni '60.
-

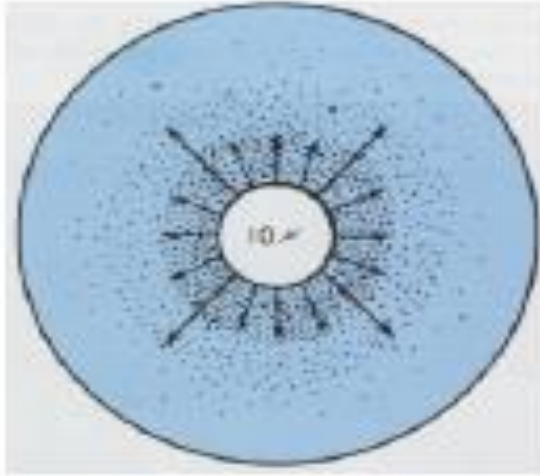
ANTIBIOGRAMMA O METODO DI KIRBY BAUER

Nel metodo dei dischetti di diffusione in agar:

- ✓ il microrganismo in esame viene coltivato su piastre di agar
- ✓ in presenza di antibiotici contenuti in dischetti di carta assorbente.

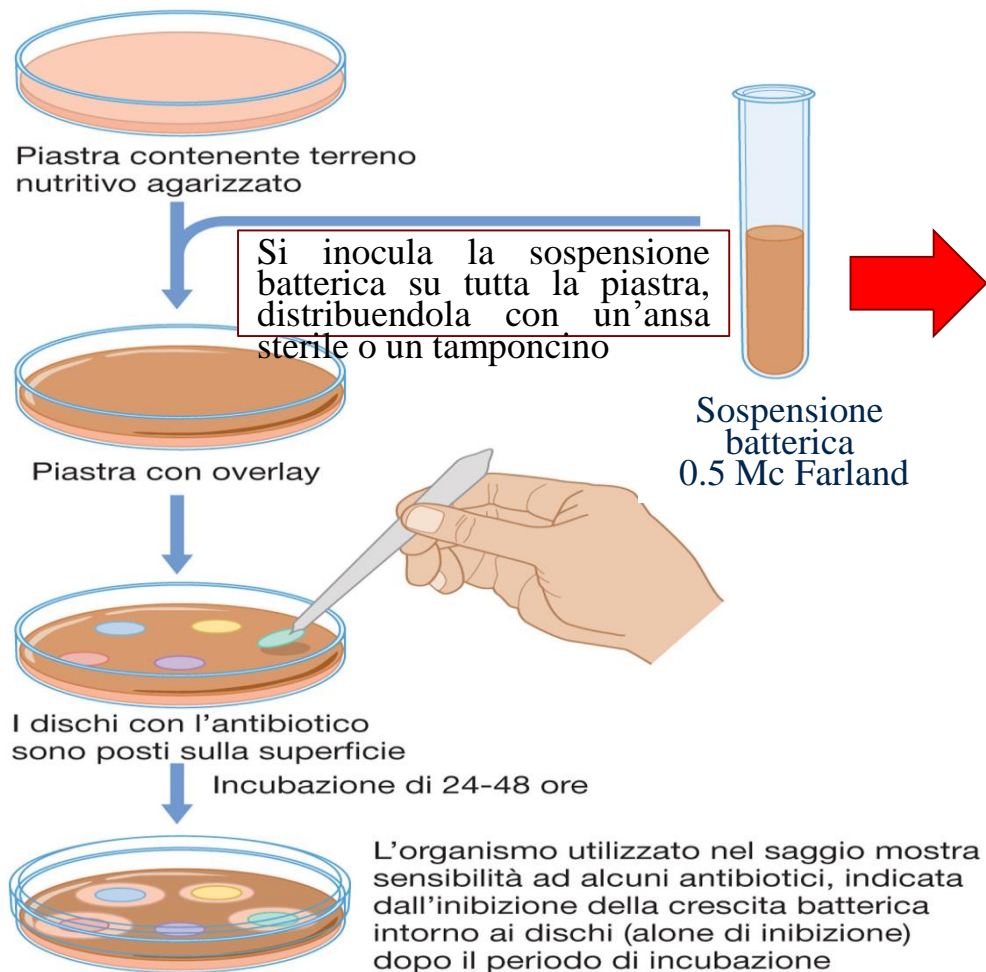
Se il microrganismo cresce normalmente attorno ai dischi significa che è **RESISTENTE**, se invece è **SENSIBILE** si rende visibile attorno al disco un alone di inibizione.

Antibiogramma o Kirby-Bauer



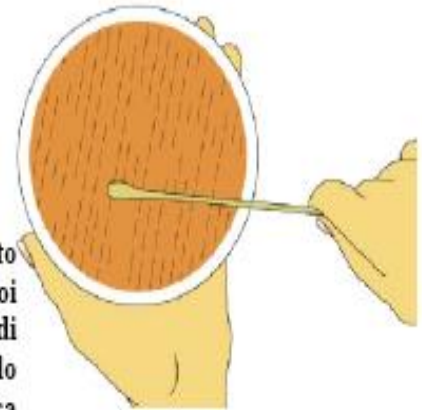
- Quantità note dell'agente antimicrobico sono adsorbite su dischetti di carta da filtro (0.5 cm) che vengono depositati sulla superficie del terreno agarizzato.
- L'agente antimicrobico diffonde dal dischetto nell'agar creando un **gradiente di concentrazione**: quanto più ci si allontana dal dischetto, tanto minore sarà la sua concentrazione, fino ad una **concentrazione critica** (MIC approssimata).
- Al di là di questo punto si avrà crescita confluyente (a tappeto), mentre nella zona più vicina al dischetto la crescita sarà assente. La zona in cui non si è avuta crescita attorno al dischetto viene chiamata **alone di inibizione**.

Antibiogramma o Kirby-Bauer: metodica



Distribuzione dell'inoculo

3. Un tampone viene introdotto nella coltura liquida e poi strisciato su tutta la superficie di una piastra di agar sterile in modo da ottenere una crescita batterica consistente ed uniforme.



Antibiogramma o Kirby-Bauer: inoculo

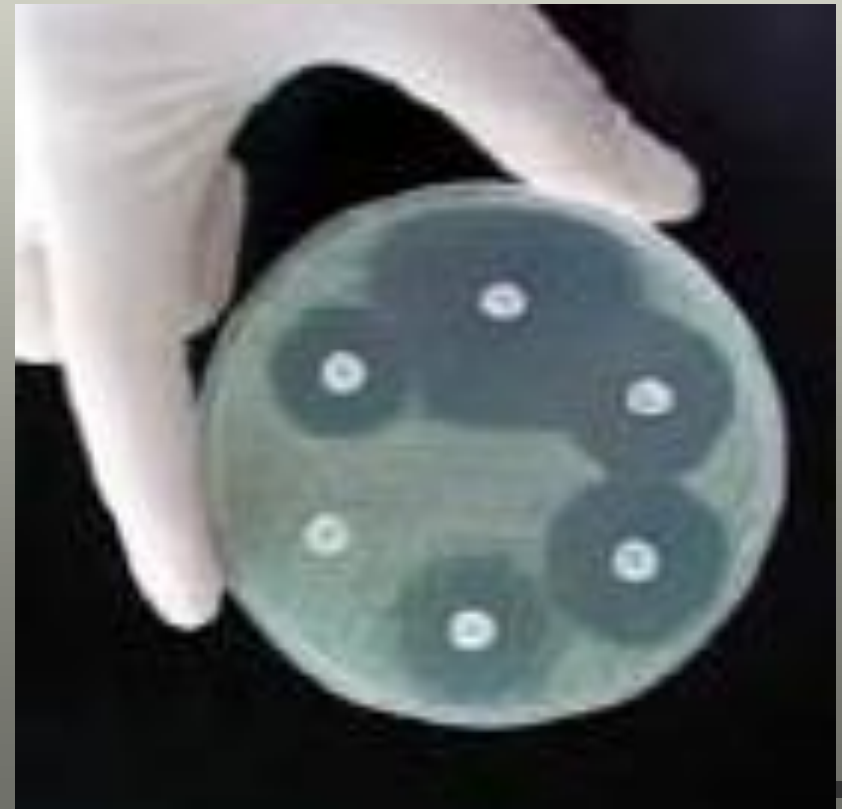
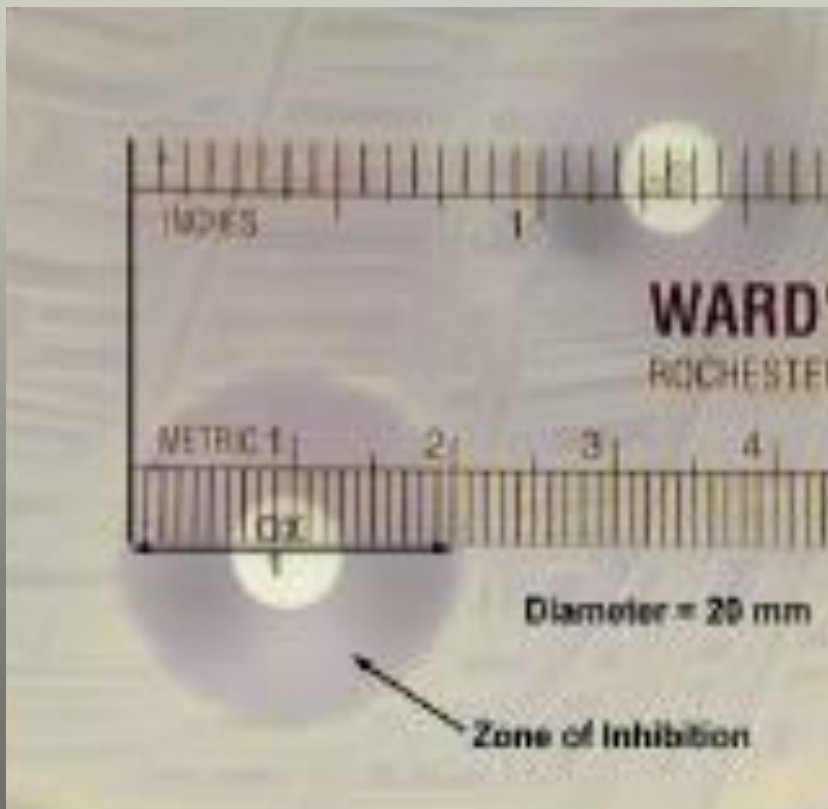
Sospensioni batteriche ottenute mediante la scala di torbidità di McFarland



Antibiogramma o Kirby-Bauer: interpretazione

Il diametro degli aloni di inibizione osservati sulla piastra viene misurato (in mm) con un righello, ed i valori ottenuti paragonati a valori standard presenti in linee guida internazionali, per stabilire se l'isolato è sensibile o meno ad un dato antibiotico

Le categorie sono: **S, sensibile**; **I, intermedio**; **R, resistente**



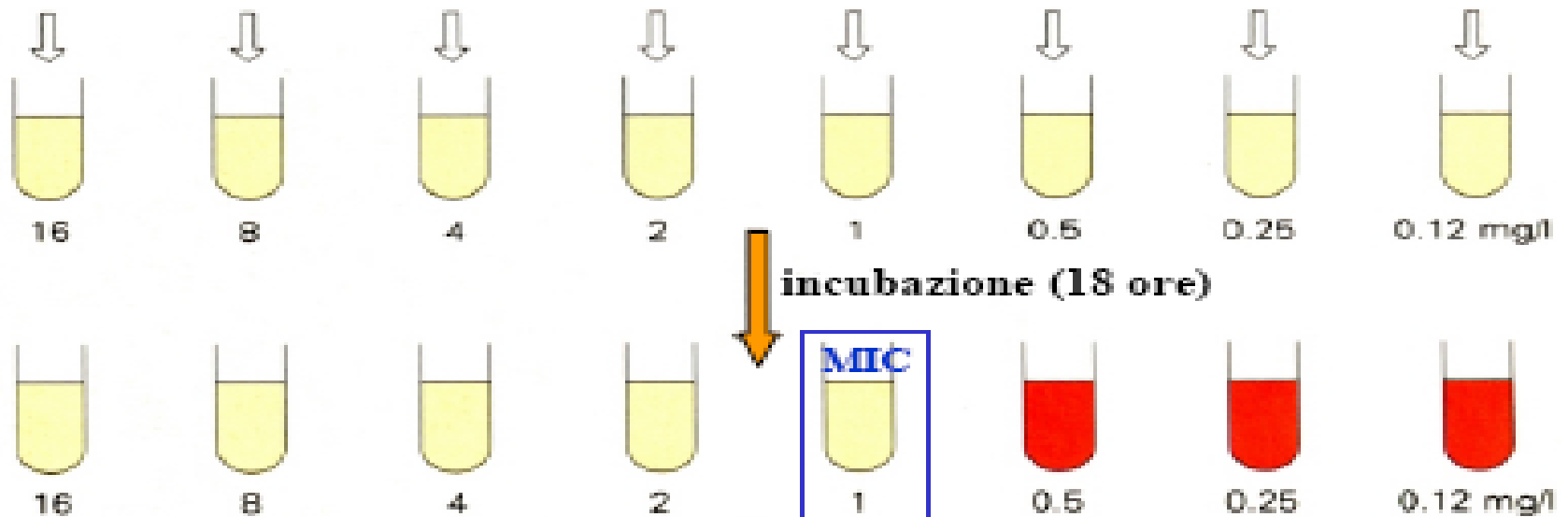
Metodo delle diluizioni scalari o della Minima Concentrazione Inibente (**MIC**)

La sensibilità del microrganismo viene valutata in base alla sua crescita o meno in brodi contenenti diverse concentrazioni dell'antibiotico.

- Questo metodo è quantitativo e consente di determinare accuratamente la **MIC** (*Minimal Inhibitory Concentration*): la concentrazione minima di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica
 - Attraverso un ulteriore passaggio, la **MBC** (*Minimal Bactericidal Concentration*): la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di uccidere la totalità dei batteri.
-

Metodo delle diluizioni scalari in brodo

1. Ad una serie di provette contenenti terreno di coltura (brodo) vengono aggiunte diluizioni scalari (in ragione di 2) dell'antibiotico da saggiare
2. Ogni provetta viene inoculata con una quantità standard (10^5 - 10^6 CFU/ml) del microrganismo in esame
3. Dopo 18h di incubazione (over-night), le provette vengono controllate per la presenza di una crescita batterica visibile (torbidità): l'assenza di torbidità del terreno denota una inibizione completa della crescita microbica.



Metodo delle diluizioni scalari in brodo: macrometodo

mg/L

128 64 32 16 8 4 2 1 0.5 C



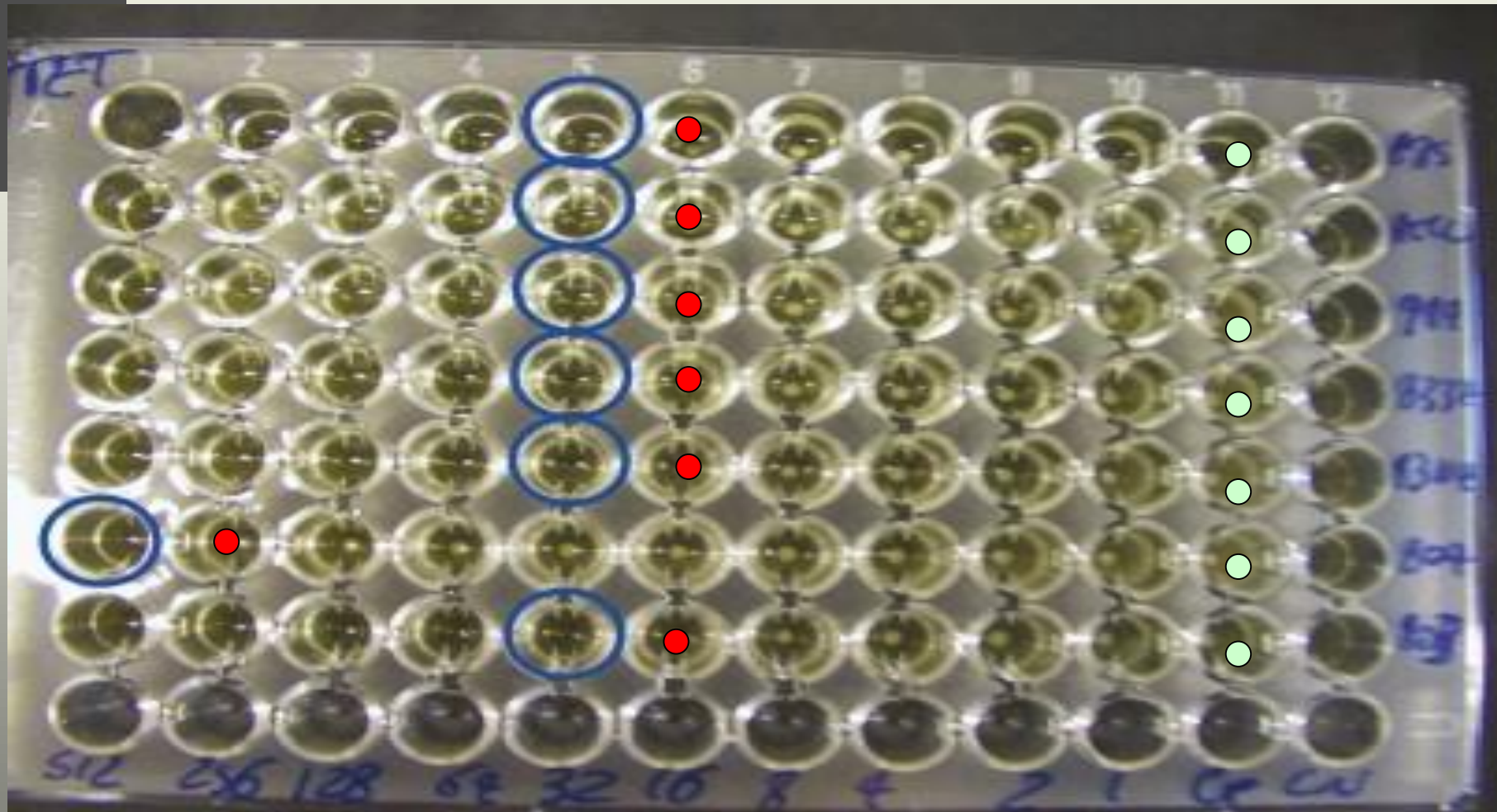
MIC (Minima Concentrazione Inibente): la concentrazione di antibiotico presente nella prima provetta dove non si osserva crescita batterica (torbidità)



Metodo delle microdiluizioni in brodo: micrometodo

- ✓ Si usano **piastrine per microtitolazioni**, per consentire un maggiore numero di analisi, con volumi minori.
- ✓ Ogni fila (orizzontale) di pozzetti contiene o un diverso antibiotico, o diversi ceppi batterici da analizzare.
- ✓ La MIC corrisponde al pozzetto contenente la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva più crescita batterica (fondello).
- ✓ La concentrazione più alta è presente nel pozzetto a sinistra; le diluizioni seriali procedono verso i pozzetti di destra (concentrazione dimezzata rispetto al pozzetto di sin; doppia rispetto al pozzetto di dx).
- ✓ L'ultimo pozzetto resta senza antibiotico, come controllo di crescita batterica.

MIC in brodo in micrometodo

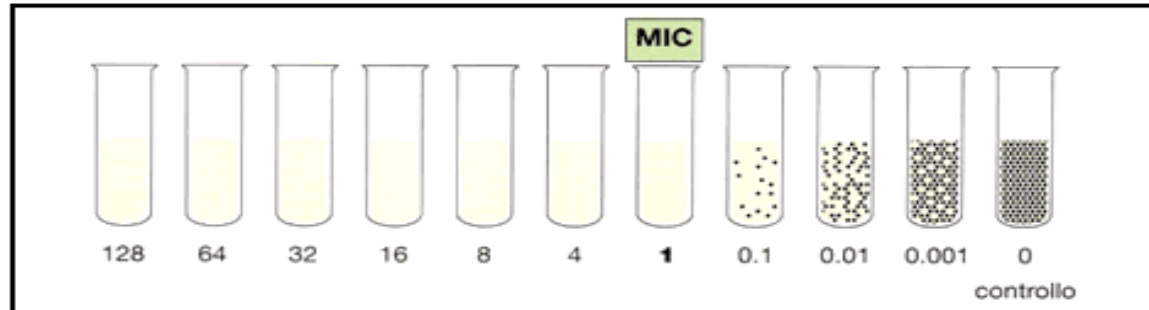


512 256 128 64 32 16 8 4 2 1 Cp Cn

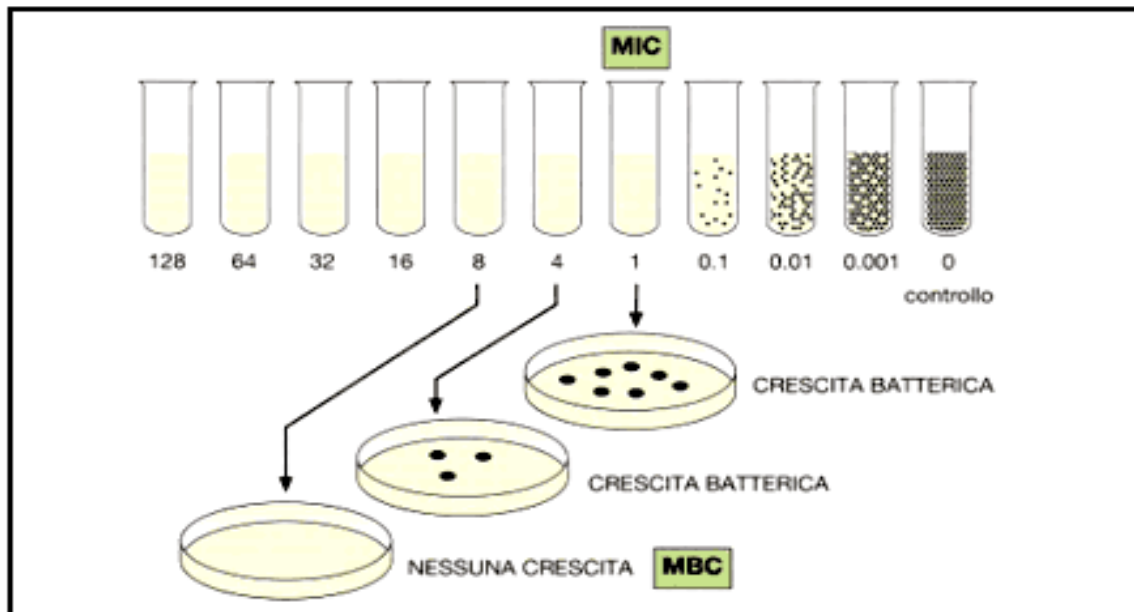
mg/L

MIC - MBC

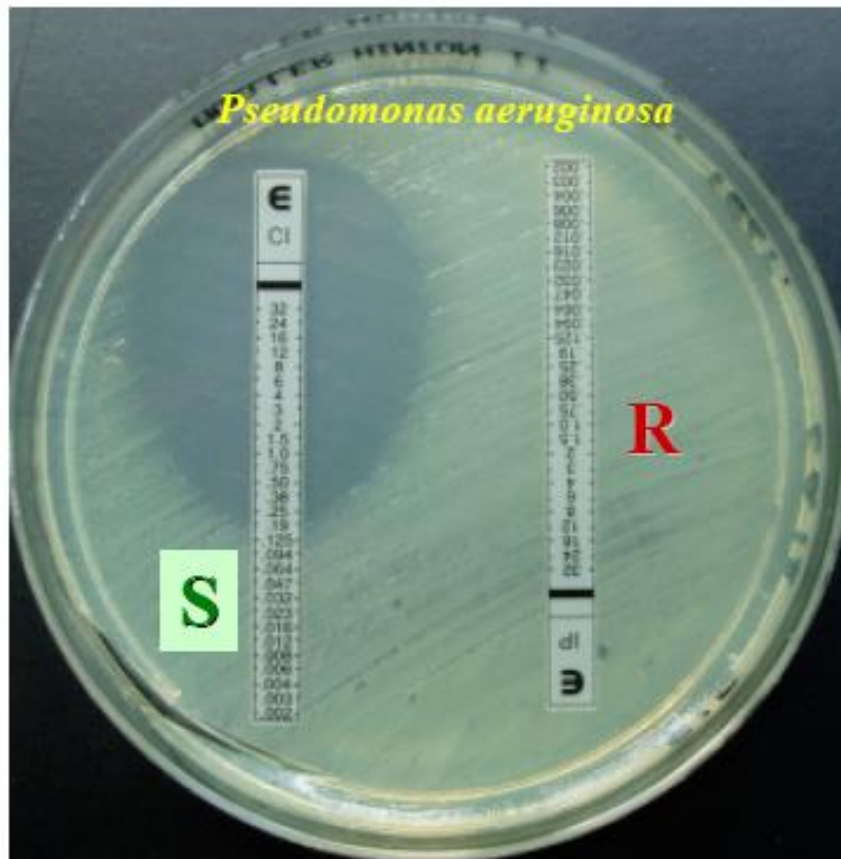
Valutazione della MIC: verifica dei controlli



Valutazione della MBC



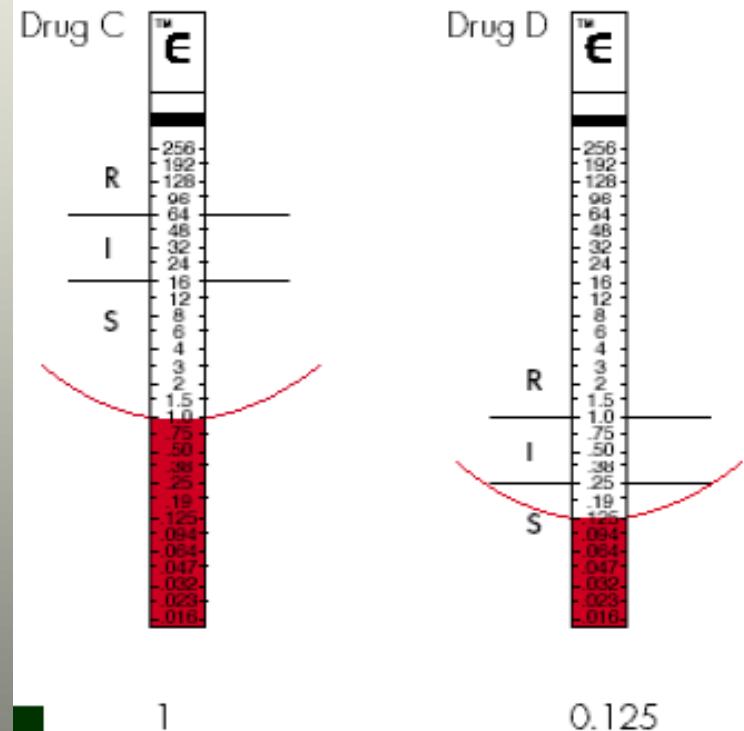
E-Test (Interpretazione)



CI: ciprofloxacina; IP: imipenem

	S	I	R
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16

Metodo epsilometrico - E-test



Interpretazione dei risultati (linee guida CLSI o EUCAST)

specie



Table 2C
Staphylococcus spp. M02 and M07

Table 2C. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS (Continued)									
O	Ampicillin	10 µg	≥ 29	—	≤ 28	≤ 0.25	—	≥ 0.5	(4) Class representative for ampicillin and amoxicillin. (5) For oxacillin-resistant staphylococci, report ampicillin as resistant or do not report.
O	Methicillin	5 µg	≥ 14	10–13	≤ 9	≤ 8	—	≥ 16	(6) For use with <i>S. aureus</i> only.
O	Nafcillin	1 µg	≥ 13	11–12	≤ 10	≤ 2	—	≥ 4	See comment (16).
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS									
(17) For oxacillin-resistant staphylococci, report as resistant or do not report.									
See comments (4) and (9).									
O	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥ 20	—	≤ 19	≤ 4/2	—	≥ 8/4	
O	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥ 15	12–14	≤ 11	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	
O	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥ 18	—	≤ 17	≤ 8/4	—	≥ 16/4	
O	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10 µg	≥ 23	—	≤ 22	≤ 8/2	—	≥ 16/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
See comment (17).									
See comments (4) and (9).									
O	Cefamandole	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefazolin	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	
O	Cefepime	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32	

Antibiogramma

MIC

S

R

S

R

antibiotic



Terapia delle infezioni batteriche

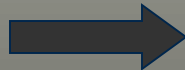
Uso di farmaci ad azione selettiva



specifiche strutture

particolari tappe metaboliche
dei microrganismi

SCOPO



determinarne l'uccisione
(azione **battericida**)

impedirne la moltiplicazione
(azione **batteriostatica**)

AGENTI ANTIMICROBICI

**SOSTANZE CHIMICHE CHE AGENDO SUI
MICRORGANISMI**

INIBISCONO



BATTERIOSTATICI

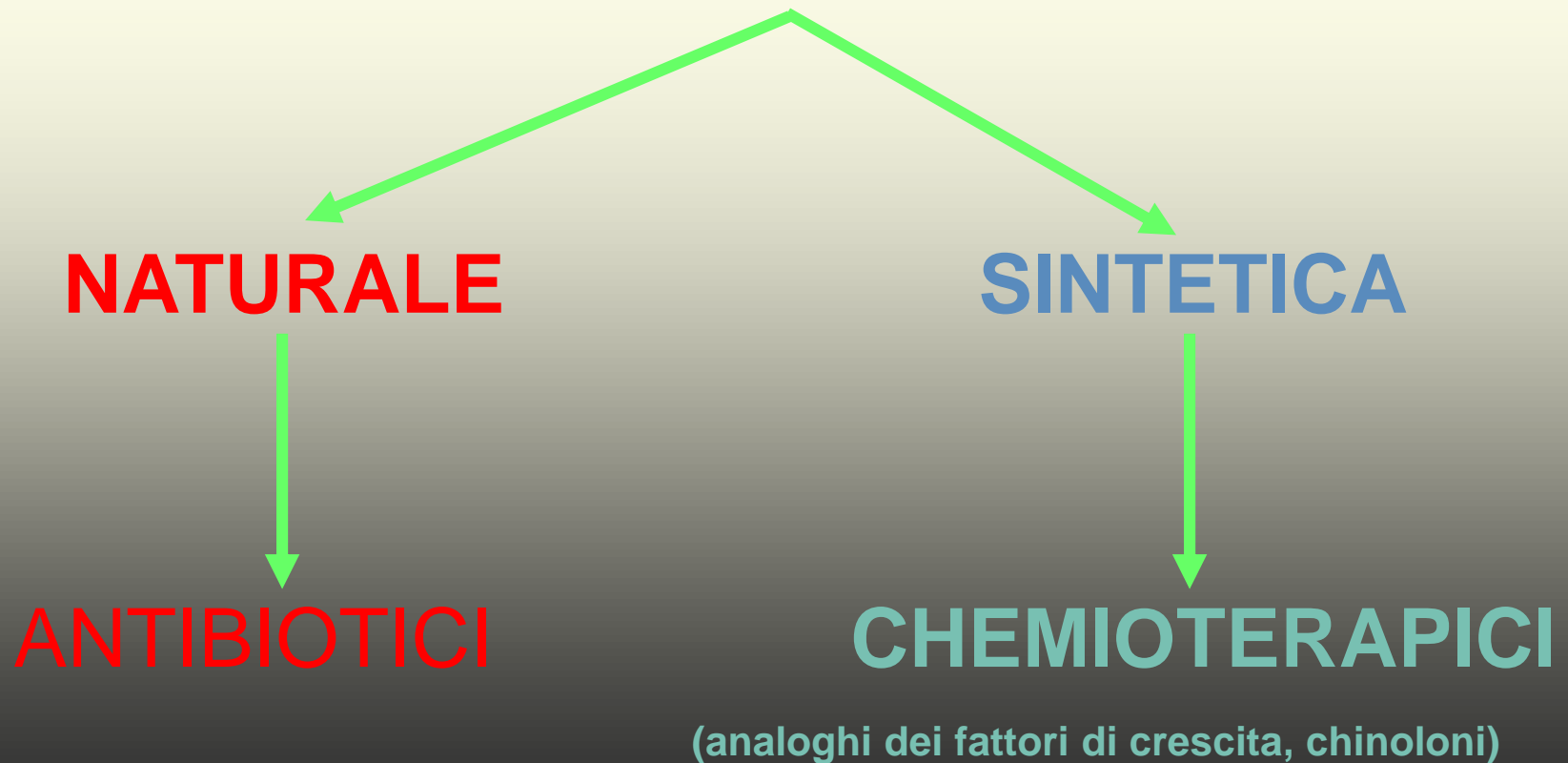
UCCIDONO



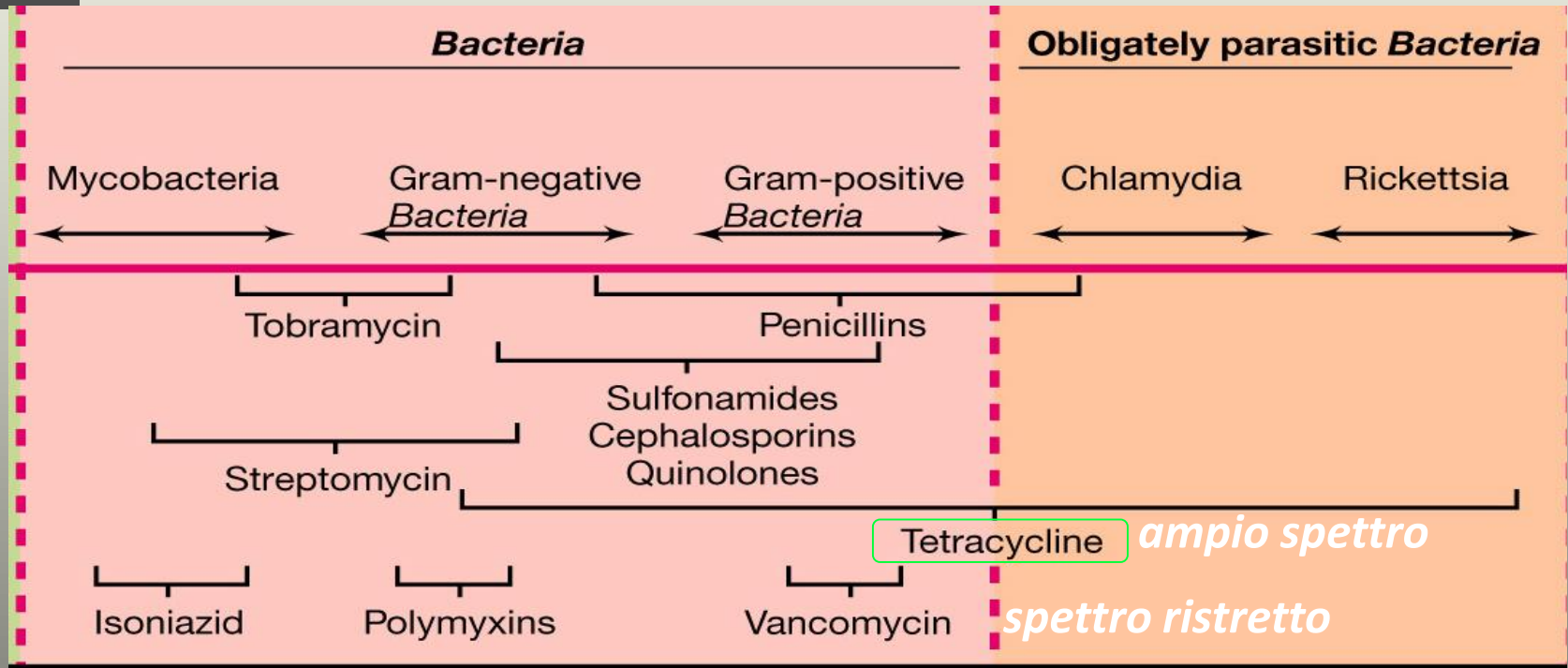
BATTERICIDI

AGENTI ANTIMICROBICI

SOSTANZE CHIMICHE DI ORIGINE



Lo spettro antibatterico

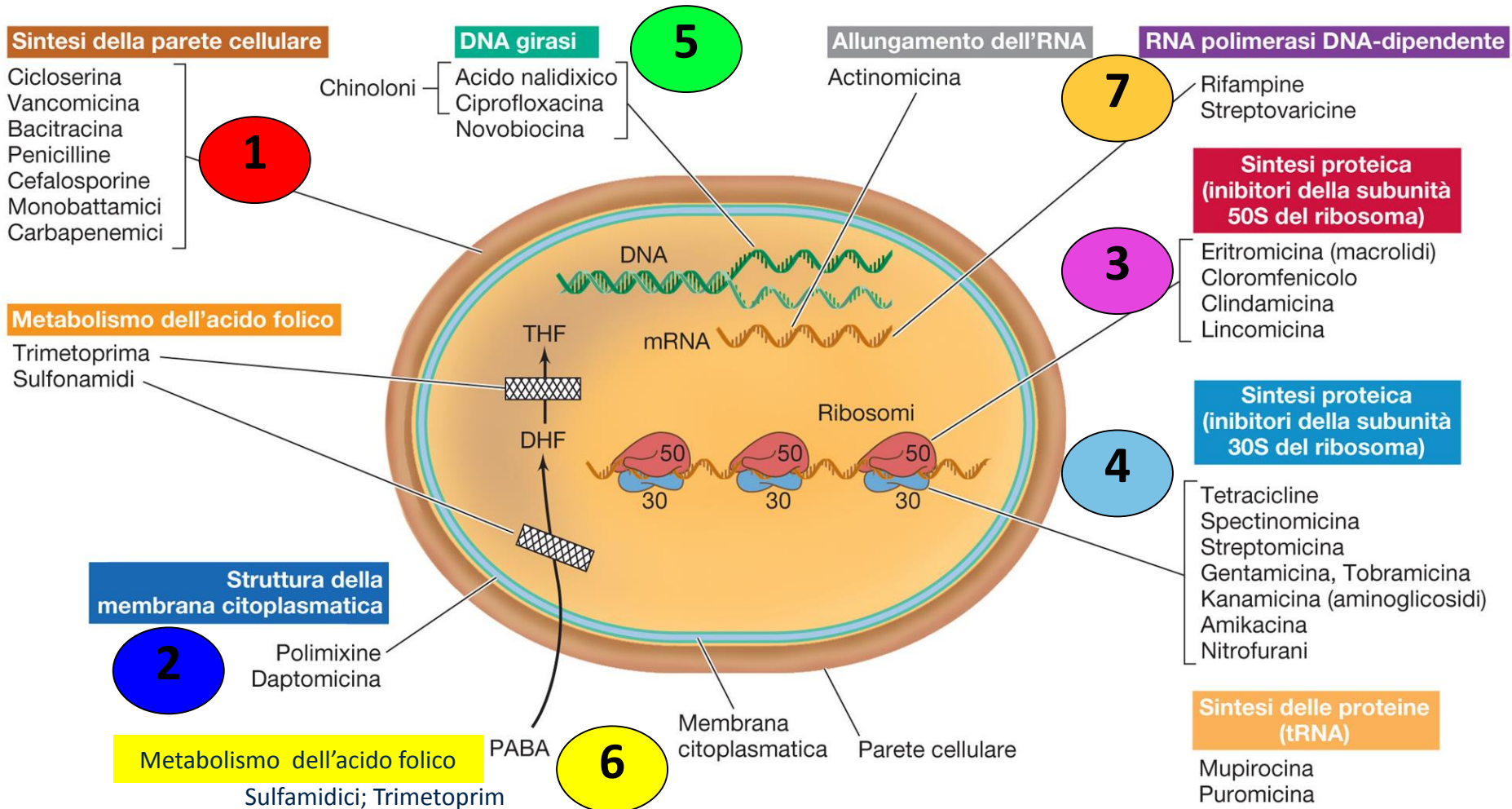


Esistono antibiotici ad **ampio spettro** ed a **spettro ristretto**, in relazione al grado di tossicità antimicrobica selettiva

Principali antibiotici: alcuni esempi

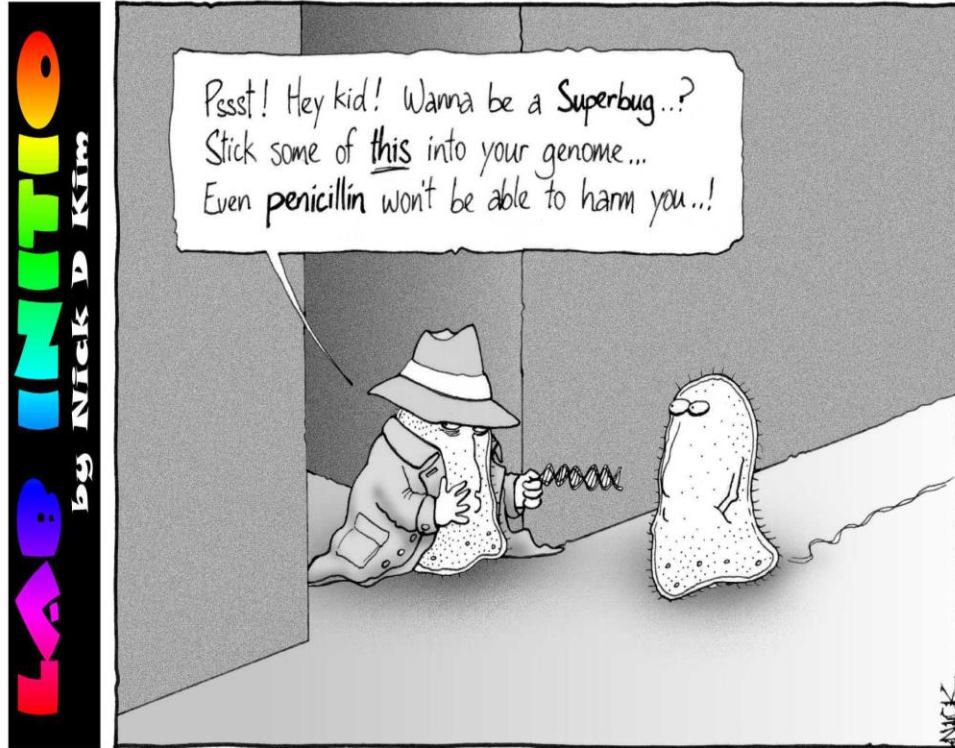
- # **Beta-lattamici**: penicilline, cefalosporine, carbapenemici
 - # **Glicopeptidi**: vancomicina e teicoplanina
 - # **Lipopeptidi**: daptomicina
 - # **Tetraciclina**: tetraciclina
 - # **Aminoglicosidi**: streptomicina, gentamicina
 - # **Macrolidi e lincosamidi**: eritromicina, clindamicina
 - # **Fluorchinoloni**: ciprofloxacina, levofloxacina
-

Meccanismo d'azione degli antibiotici

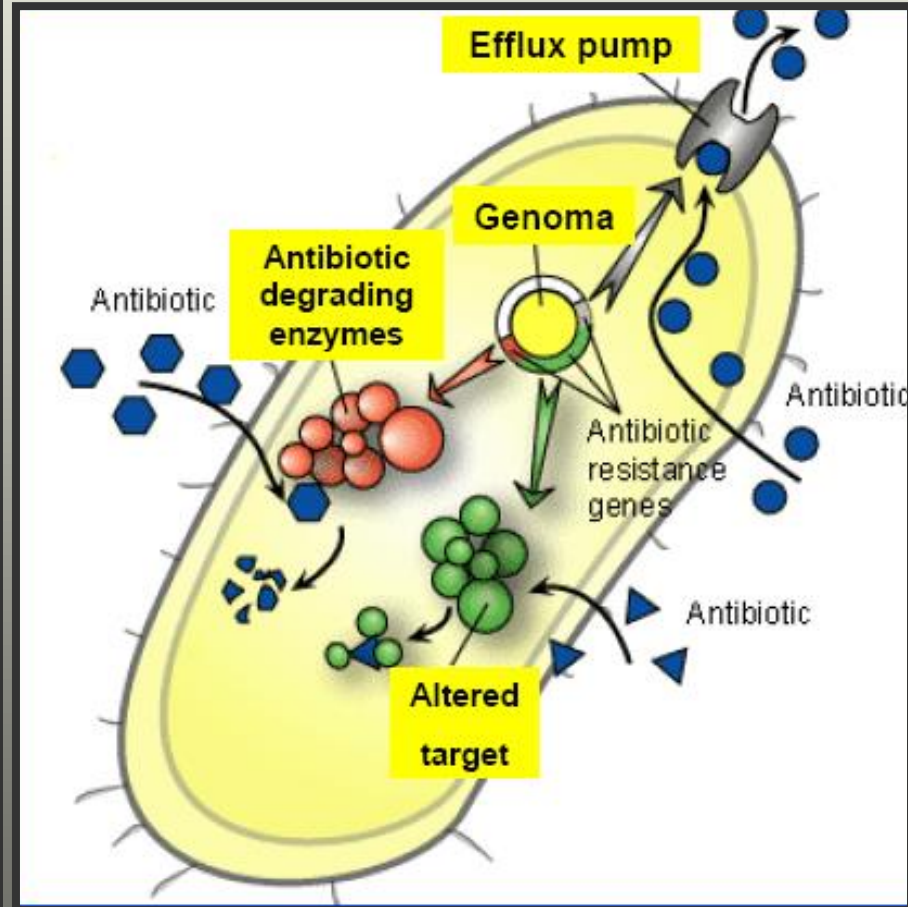


The dark side of the moon!!

Resistenza agli antibiotici



It was on a short-cut through the hospital kitchens that Albert was first approached by a member of the Antibiotic Resistance.



Resistenza naturale o intrinseca

DEFINIZIONE : “..insensibilità costituzionale di una specie batterica nei confronti di un dato antibiotico...”

1) E' immutabile nel tempo

2) Si manifesta in tutti i ceppi di una stessa specie batterica

- # Al microrganismo può mancare la struttura su cui agisce l'antibiotico, come avviene con i micoplasmi che sono privi della parete cellulare e quindi insensibili alla penicillina
- # La struttura della parete cellulare o la membrana citoplasmatica di un microrganismo possono essere impermeabili a un antibiotico

Resistenza acquisita

- DEFINIZIONE : "...ceppo batterico che, pur appartenendo a una specie microbica originariamente sensibile a un certo antibiotico, ha perduto la sensibilità verso concentrazioni del farmaco terapeuticamente raggiungibili *in vitro*..."



Resistenza agli antibiotici: evoluzione

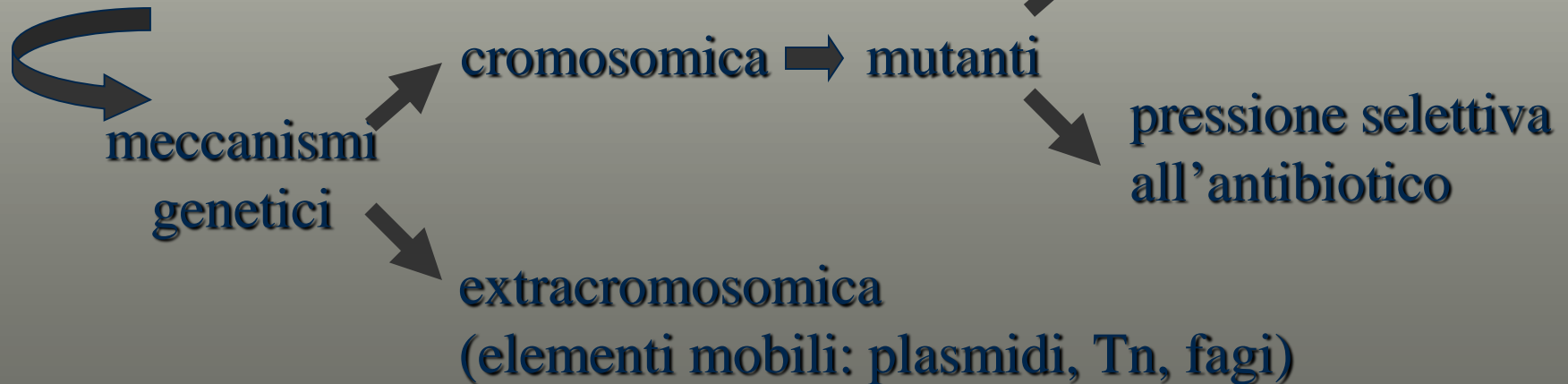
- # ***Evoluzione verticale***: è strettamente considerata “Darwiniana” sul principio della selezione naturale. Se una mutazione spontanea interviene sul cromosoma batterico, essa viene trasferita alla progenie.
 - # ***Evoluzione orizzontale***: significa acquisire geni da altri organismi mediante i processi di trasferimento genetici mediati da elementi mobili quali plasmidi, fagi o trasposoni.
-

Resistenza agli antibiotici

**Resistenza
naturale**

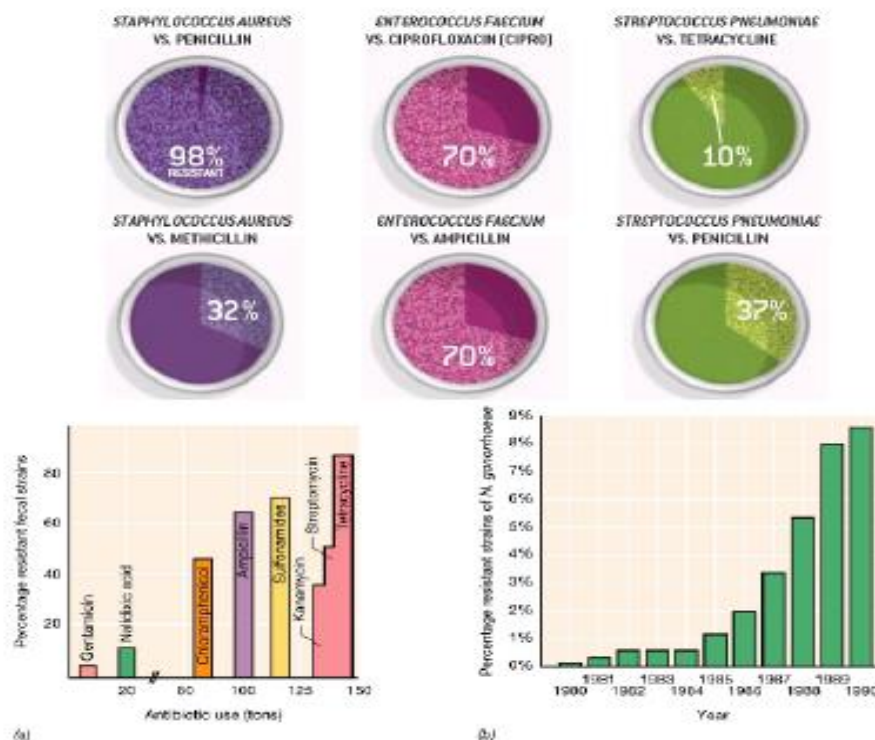
➡ comune a tutti i ceppi di una specie batterica

**Resistenza
acquisita**



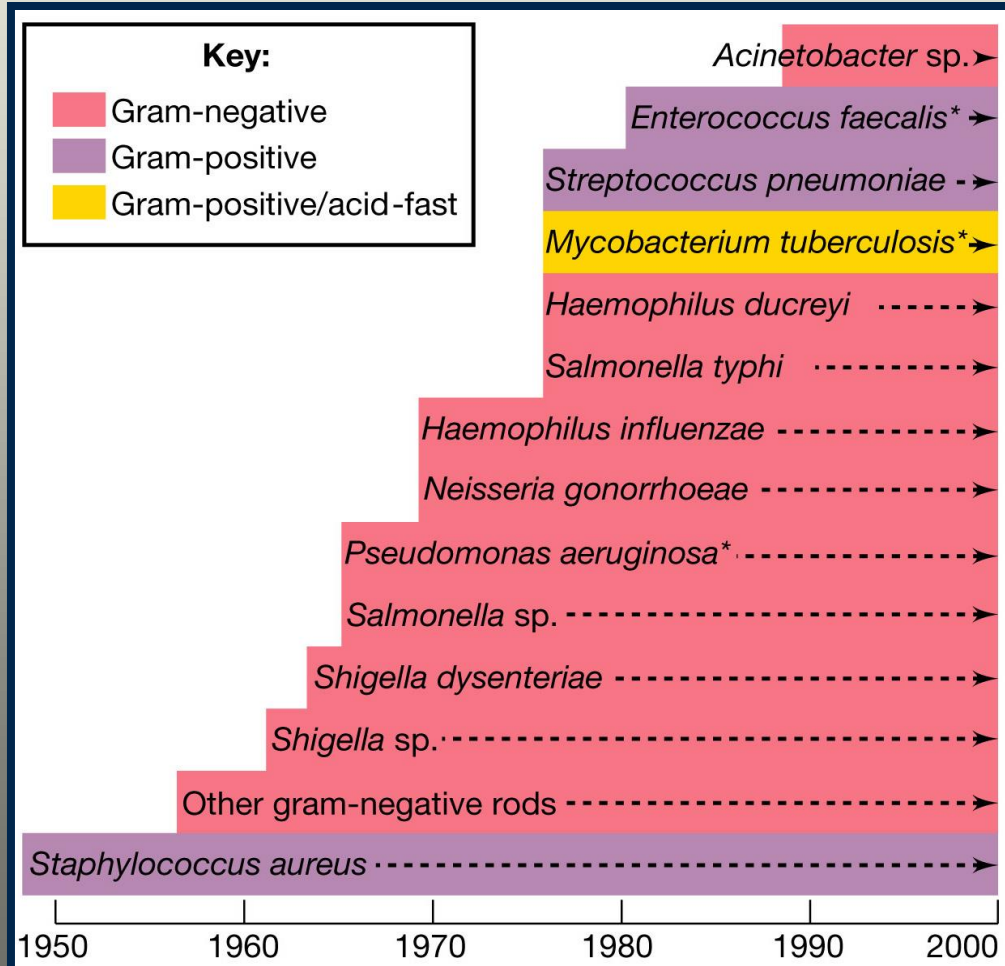
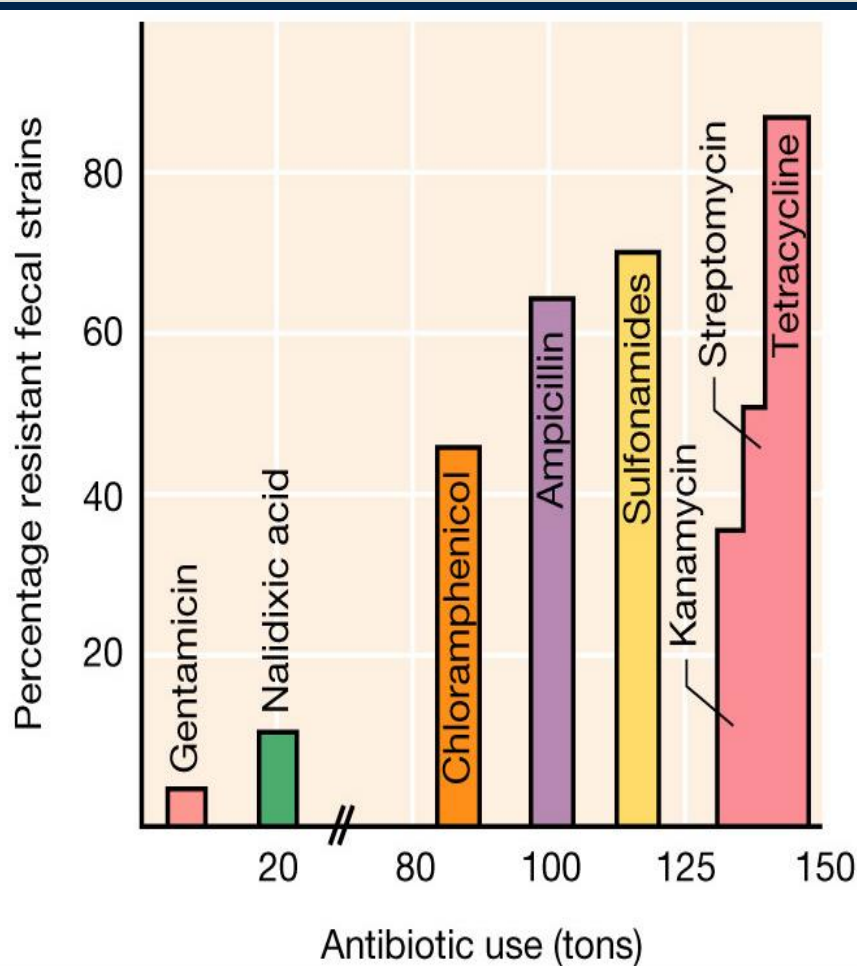
Perchè studiare la R agli antibiotici?

Resistenza ai farmaci



L'uso inappropriato ed esagerato di farmaci antimicrobici sta portando a un rapido sviluppo, nei microrganismi patogeni, di resistenze specifiche a tali sostanze. La scoperta e l'impiego in clinica di molti antibiotici è andata di pari passo con la comparsa di batteri resistenti alla loro azione.

Relazione tra "abuso" di antibiotici e aumento di batteri R

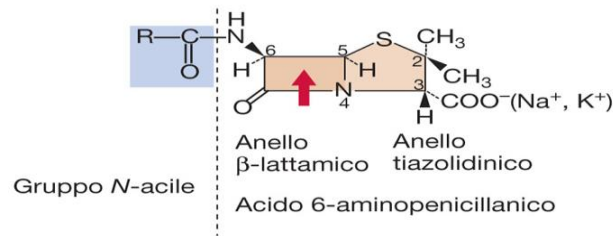


Meccanismi molecolari di resistenza agli antibiotici

Meccanismi generali

- 1) Inattivazione enzimatica dell'antibiotico mediante alterazione della sua struttura chimica
 - 2) Alterazione del sito bersaglio mediante mutazione o modificazione enzimatica
 - 3) Modificazione della permeabilità della parete batterica mediante efflusso
 - 4) Sovra-espressione del bersaglio inibito dall'antibiotico
 - 5) Sviluppo di vie metaboliche alternative
-

Antibiotici β - lattamici



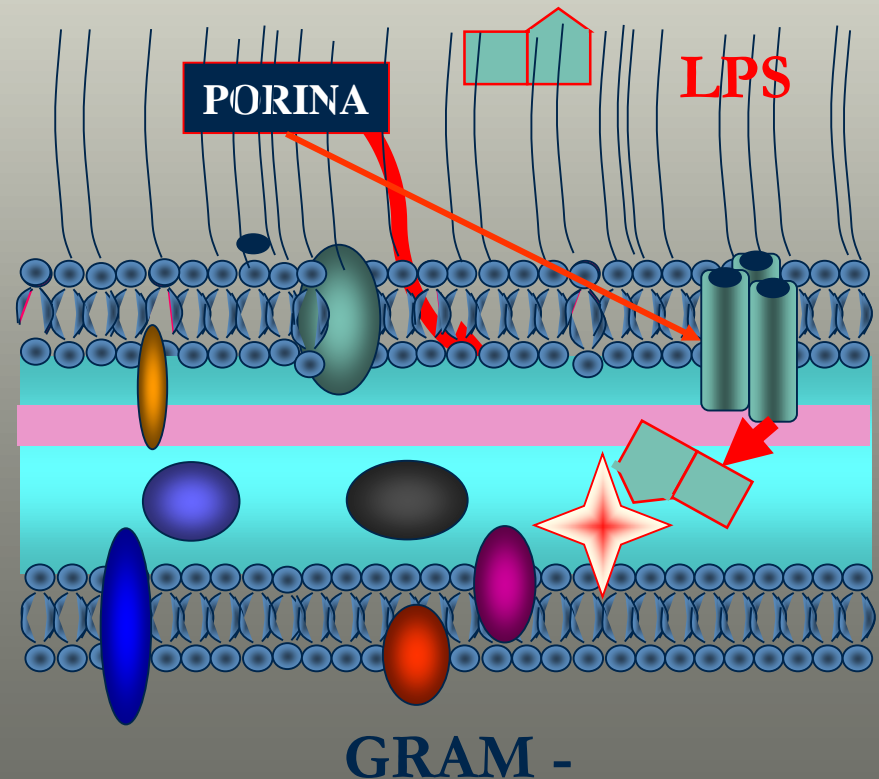
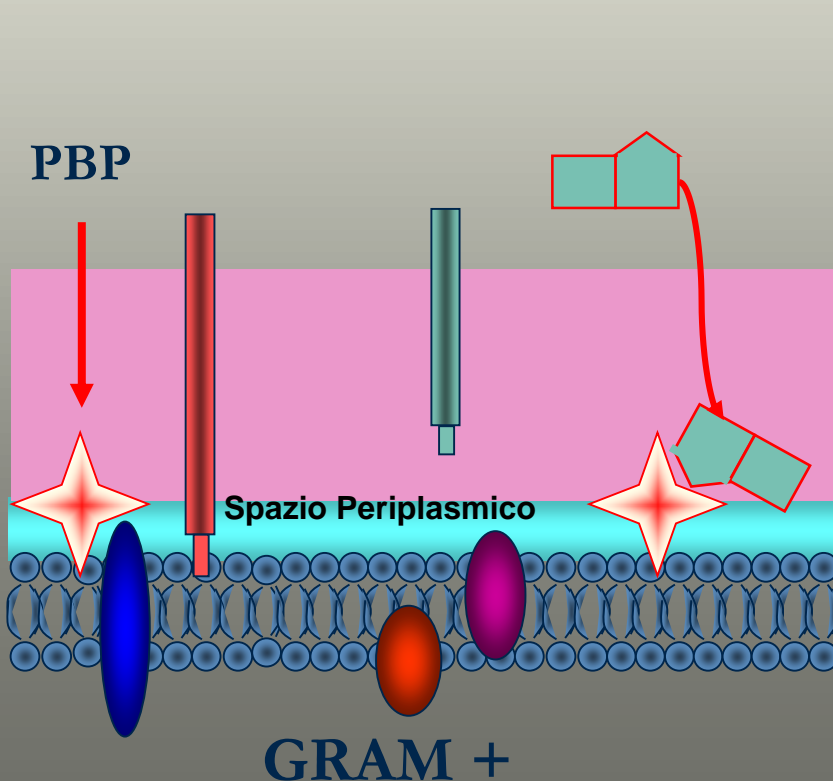
In comune
hanno
l'anello
 β -lattamico

Designazione	Gruppo N-acile
PENICILLINA NATURALE Benzilpenicillina (penicillina G) Attiva sui Gram-positivi, sensibile alle β -lattamasi	
PENICILLINE SEMISINTETICHE Meticillina Stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	
Oxacillina Stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	
Ampicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro i batteri Gram-negativi), stabile in ambiente acido, resistente alle β -lattamasi	
Carbenicillina Ampio spettro di attività (specialmente contro <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>), stabile in ambiente acido ma inefficiente per via orale, sensibile alle β -lattamasi	

ANTIBIOTICI $\beta\epsilon\tau\alpha$ -LATTAMICI

MECCANISMO D'AZIONE SELETTIVO

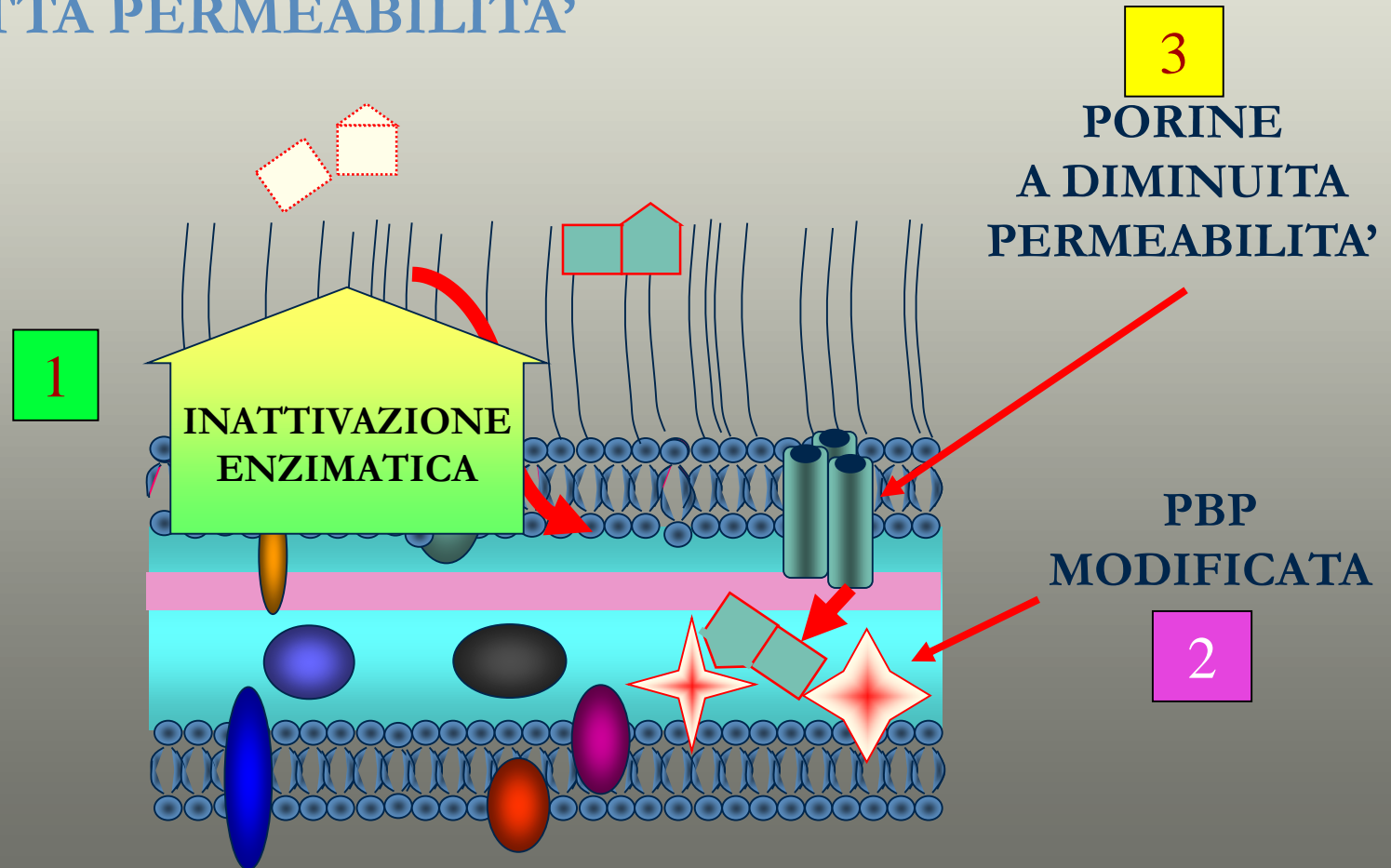
INTERAZIONE CON PROTEINE ENZIMATICHE RESPONSABILI DEL
PROCESSAMENTO TERMINALE DEL PEPTIDOGLICANO
(TRANSPEPTIDASI, TRANSGLICOSIDASI E CARBOSSIPEPTIDASI) DETTE
“PENICILLIN BINDING PROTEINS” – PBP – A LIVELLO DELLA
MEMBRANA CITOPLASMATICA



ANTIBIOTICI $\beta\epsilon\tau\alpha$ -LATTAMICI

RESISTENZA

1. INATTIVAZIONE ENZIMATICA (β -lattamasi)
2. MODIFICAZIONE DEL BERSAGLIO
3. RIDOTTA PERMEABILITA'



1. β -lattamasi

- Le β -lattamasi sono enzimi batterici capaci di *degradare* gli antibiotici β -lattamici.
- L'inattivazione dei β -lattamici da parte delle β -lattamasi è dovuta *all'idrolisi dell'anello β -lattamico*.
- La loro produzione, ampiamente diffusa nel mondo microbico, rappresenta il principale meccanismo con cui i batteri si difendono da questi antibiotici.
- Le β -lattamasi sono *enzimi secreti* che svolgono la loro funzione all'esterno della membrana plasmatica.
- La produzione di β -lattamasi è in alcuni casi *costitutiva* mentre in altri risulta *indotta* in presenza di certi substrati β -lattamici.

Inattivazione dell'antibiotico mediante alterazione della sua struttura chimica

®-lattamasi

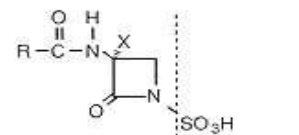
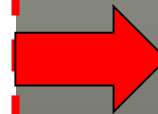


Enzima che idrolizza l'anello ®-lattamico, indispensabile per l'attività dell'antibiotico

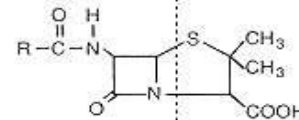
Penicillina

Cefalosporina

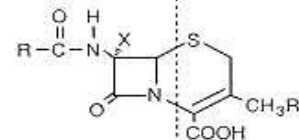
In questo caso sarà necessario abbinare un inibitore della ®lattamasi



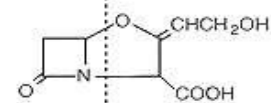
Monobactam



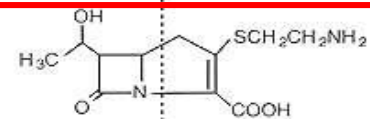
Penicillin



Cephalosporin
Cephamycin



Clavulanic acid



Thienamycin

2. Resistenza alla meticillina in *Staphylococcus aureus* (MRSA)



Acquisizione di un nuovo gene di resistenza (*mecA*)
che codifica una PBP2A alternativa

Gene

mRNA

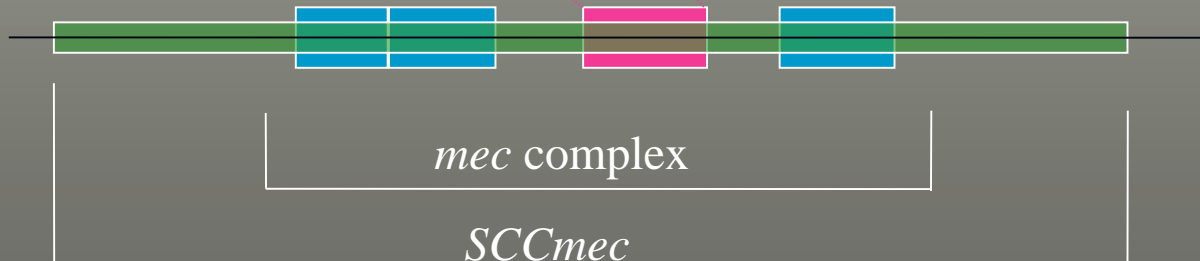
Proteina

mecA



PBP2a

Bassa affinità
per i
 β -lattamici



GLICOPEPTIDI

Vancomicina e Teicoplanina

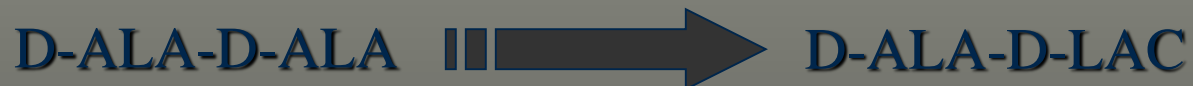
MECCANISMO D'AZIONE

INIBIZIONE DELLA SINTESI DELLA PARETE, PER BLOCCO DEL TRASPORTO DELL'UNITA' BASALE SUL PUNTO DI ACCRESCIMENTO. SI LEGANO AL DIPEPTIDE TERMINALE D-Ala-D-Ala
BATTERICIDI

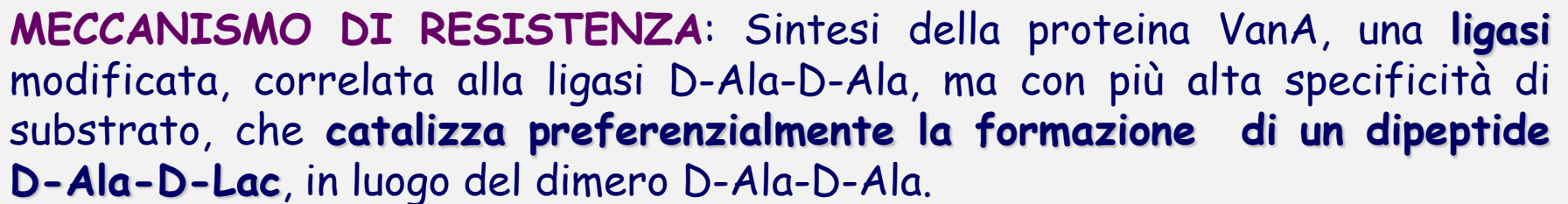
MECCANISMO DI RESISTENZA

Sviluppo di vie metaboliche alternative

Modifica della struttura del peptidoglicano



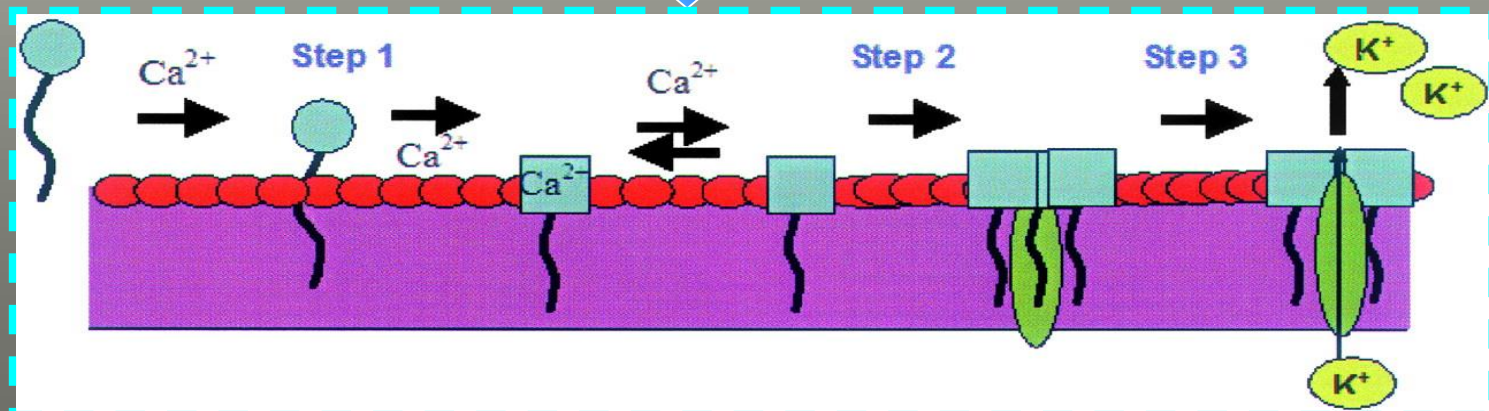
Resistenza



Lipopeptide ciclico, prodotto naturale di fermentazione di *Streptomyces roseosporus*

Meccanismo d'azione rivolto verso la membrana cellulare

Daptomicina



Sulfamidici e trimetoprim

- I sulfamidici sono stati i primi chemioterapici usati per inibire la crescita dei batteri.
- Agisce come analogo di una vitamina, l'acido folico, precursore degli acidi nucleici, bloccandone la sintesi.
- E' attiva contro i batteri che sono in grado di sintetizzare acido folico, ma non contro gli organismi superiori, che devono procurarselo con la dieta.
- Il trimetoprim è analogo dell'acido diidrofólico (richiesto per la sintesi delle purine, della timina, e di alcuni aminoacidi).

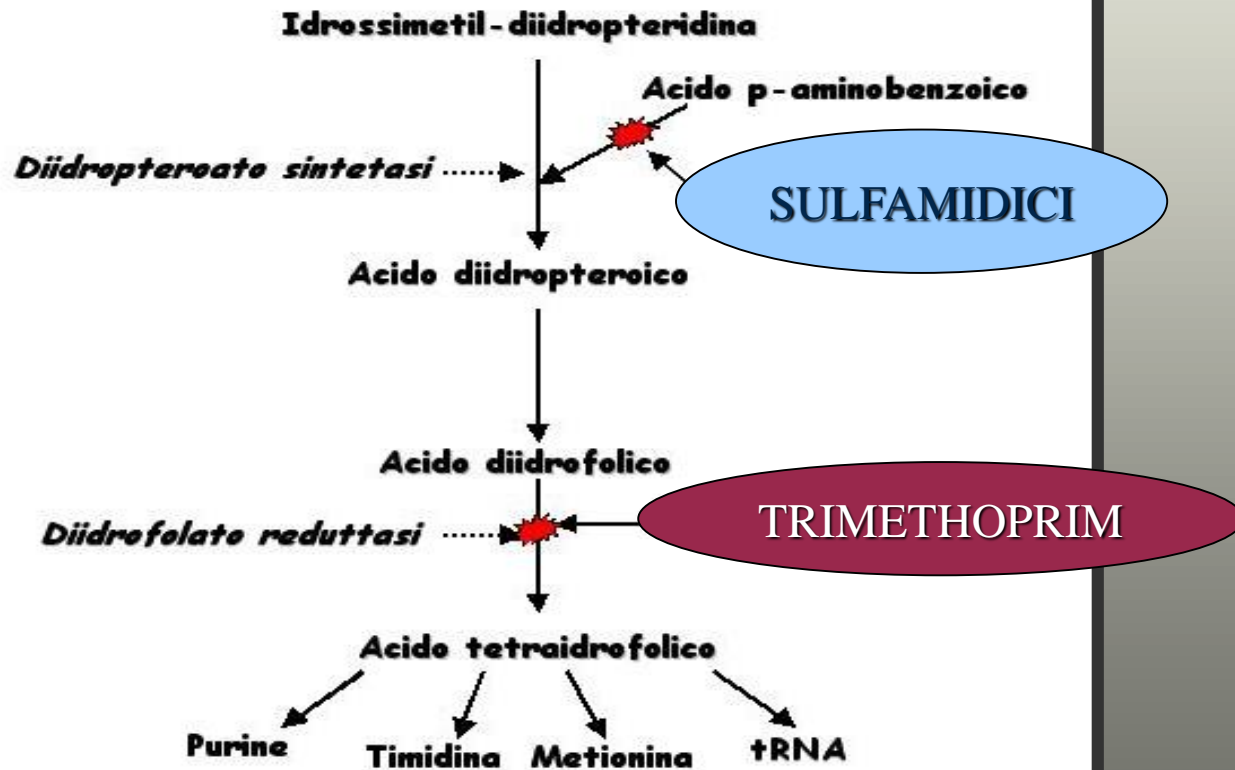
FARMACI ANTIMICROBICI SINTETICI

Antibiotici antagonisti competitivi

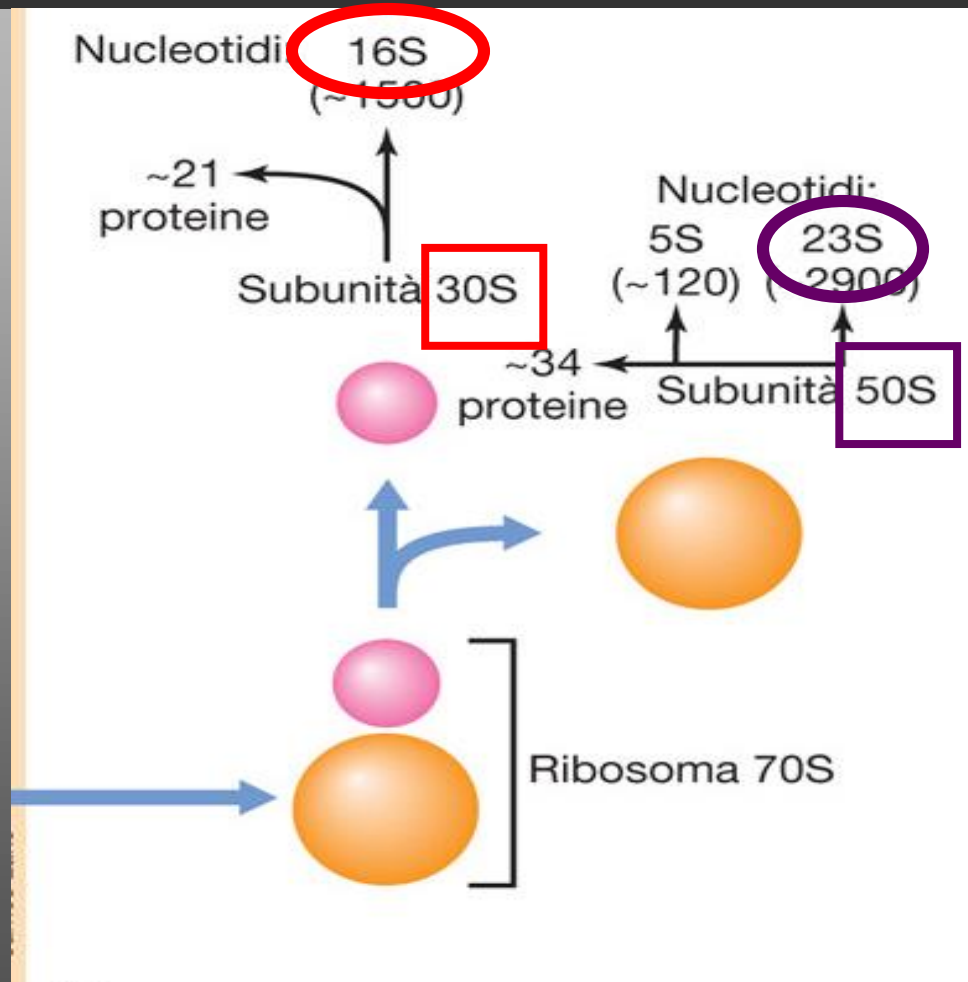
Sulfamidici e Trimethoprim (Bactrim)

Inibitori della sintesi dell'acido folico

Precursore degli acidi nucleici

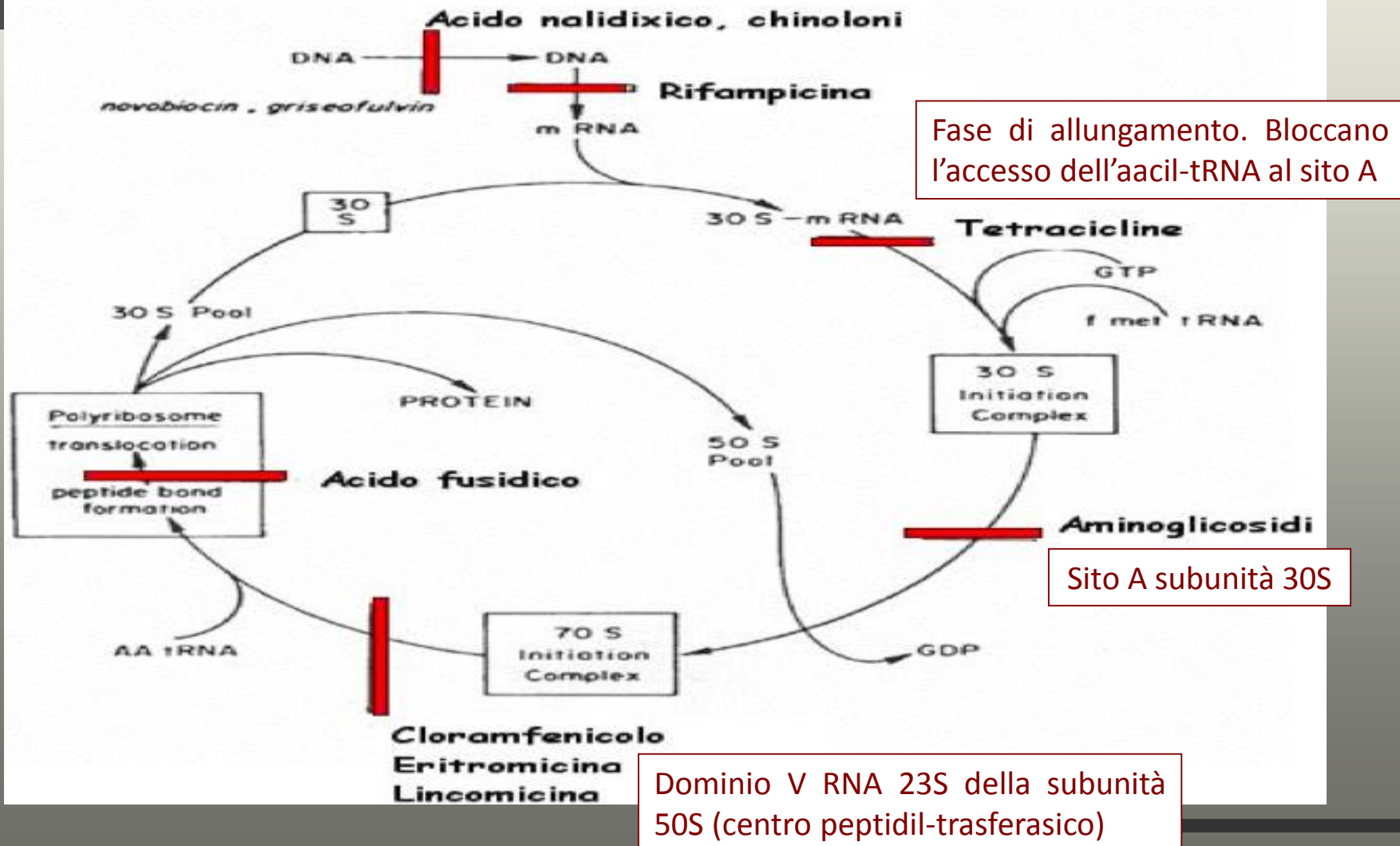


Inibitori della sintesi proteica.....COME?



La sintesi proteica.....ha bisogno del ribosoma integro

Inibizioni della sintesi proteica in vari stadi ad opera di diverse classi di antibiotici



TETRACICLINE

Le tetracicline sono un gruppo di antibiotici prodotti da Streptomiceti e caratterizzati da una **struttura molecolare tetraciclica**.

La loro azione antibatterica è dovuta ad un blocco della sintesi proteica in una **fase molto iniziale**: esse si legano alla subunità ribosomale **30S** subito dopo il legame dell'mRNA, *impedendo l'attacco dell'aminoacil-tRNA* a livello del codone d'inizio e bloccando la formazione del polisoma.

TETRACICLINE

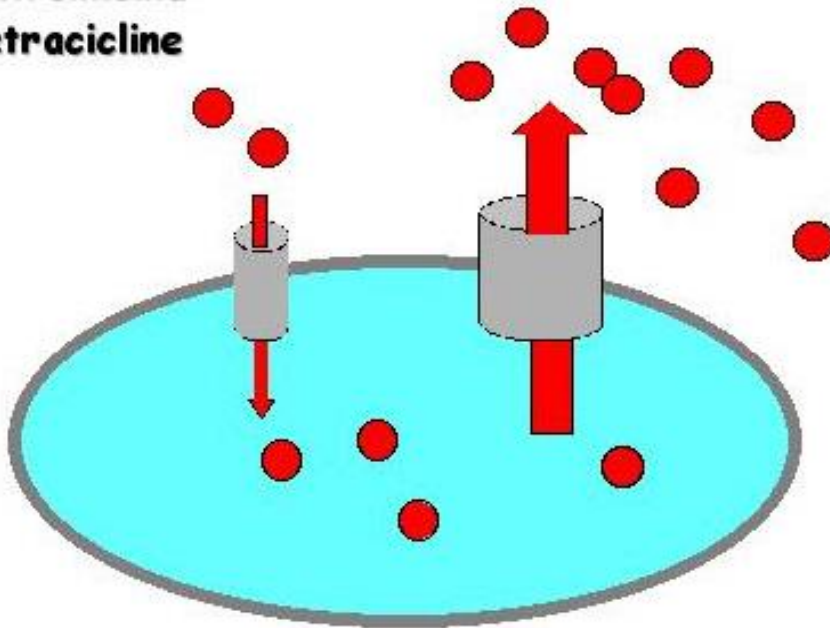
RESISTENZA

1. ***MODIFICAZIONE DELLA PERMEABILITA' DI MEMBRANA (sistemi di efflusso)***
2. ***Protezione e/o mutazione ribosomale***
3. ***Inattivazione enzimatica***

1. MODIFICAZIONE DELLA PERMEABILITA' DI MEMBRANA (sistemi o pompe di efflusso)

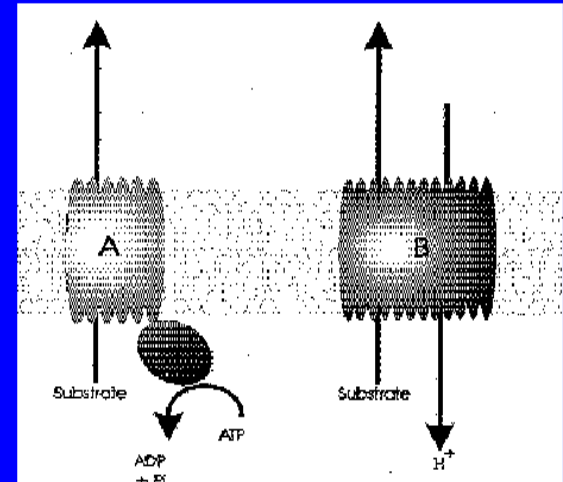
Antibiotici verso i quali è stato evidenziato questo meccanismo di resistenza:

- Eritromicina
- Tetracicline



Gli antibiotici vengono pompati fuori dalla cellula da specifiche proteine di membrana più velocemente di quanto non riescano ad entrare e le concentrazioni intracitoplasmatiche non raggiungono livelli tali da inibire le sintesi proteiche.

Efflux pumps



A - ABC transporters

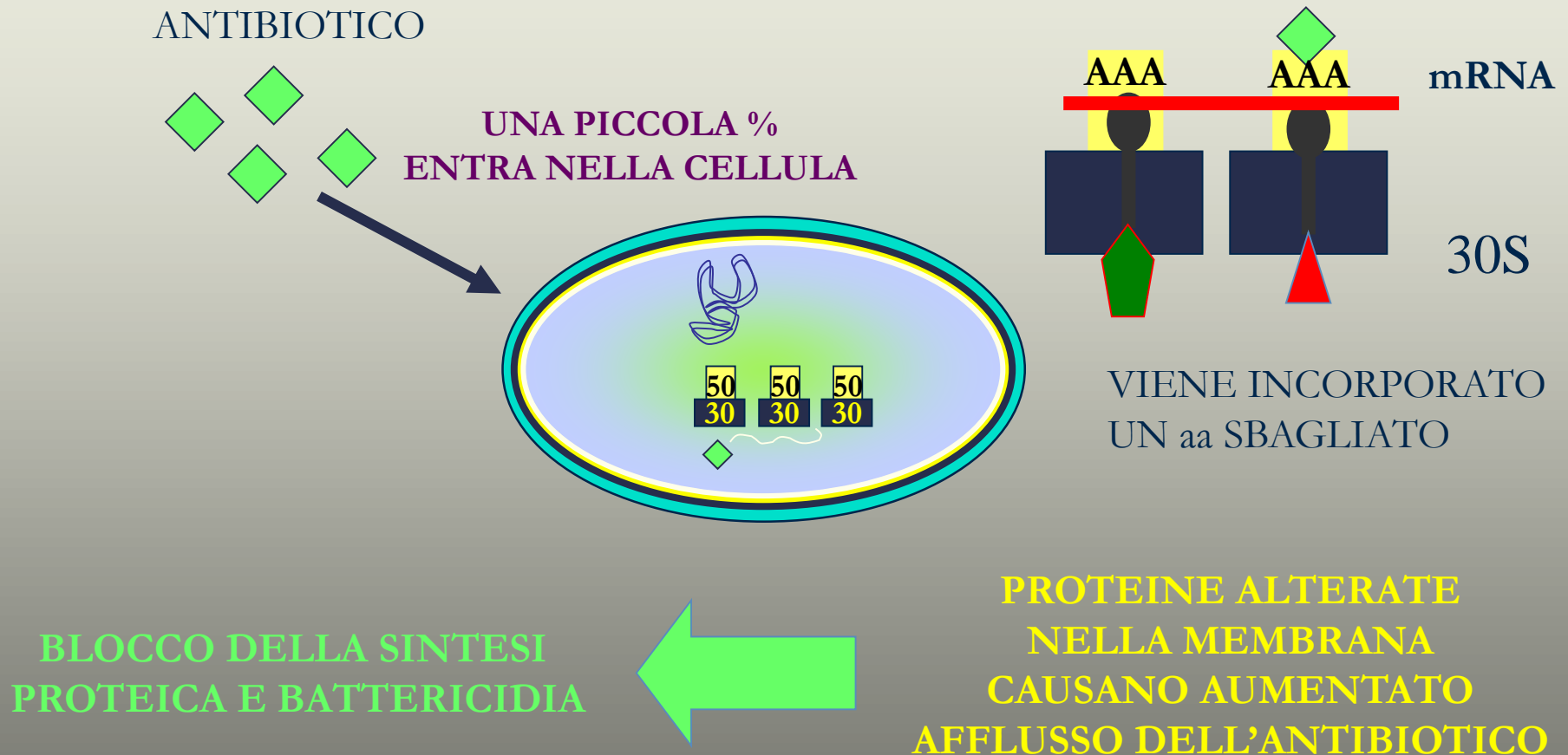
B - secondary transporters

AMINOGLICOSIDI

- Gli aminoglicosidi (streptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina...) consistono di due o più **aminozuccheri** uniti da un legame glicosidico a un nucleo **esoso** che generalmente è in **posizione centrale**.
- Agiscono legandosi irreversibilmente alla **subunità ribosomale 30S** e bloccando, di conseguenza, la sintesi proteica.
- Determinano anche **un'alterata lettura dell'mRNA** portando all'**incorporazione di aminoacidi errati** con produzione di **proteine anomale o non funzionali**.
- ATTIVITA' BATTERICIDA correlata alla capacità di indurre un'errata lettura dell'mRNA.

AMINOGLICOSIDI

MECCANISMO D'AZIONE



AMINOGLICOSIDI

RESISTENZA

1. INATTIVAZIONE ENZIMATICA
2. MODIFICAZIONE DEL BERSAGLIO
 1. MODIFICAZIONE DELLA PERMEABILITA'

MACROLIDI E LINCOSAMIDI

I **macrolidi** (eritromicina, roxitromicina, claritromicina, spiramicina, etc.) sono costituiti da ***un anello lattonico*** che può essere a **12, 14 o 16** atomi di C.

Lincosamidi, classe affine, sono antibiotici batteriostatici con un meccanismo e spettro d'azione simile a quello dei macrolidi, pur avendo una struttura chimica molto diversa.

MACROLIDI

MECCANISMO D'AZIONE

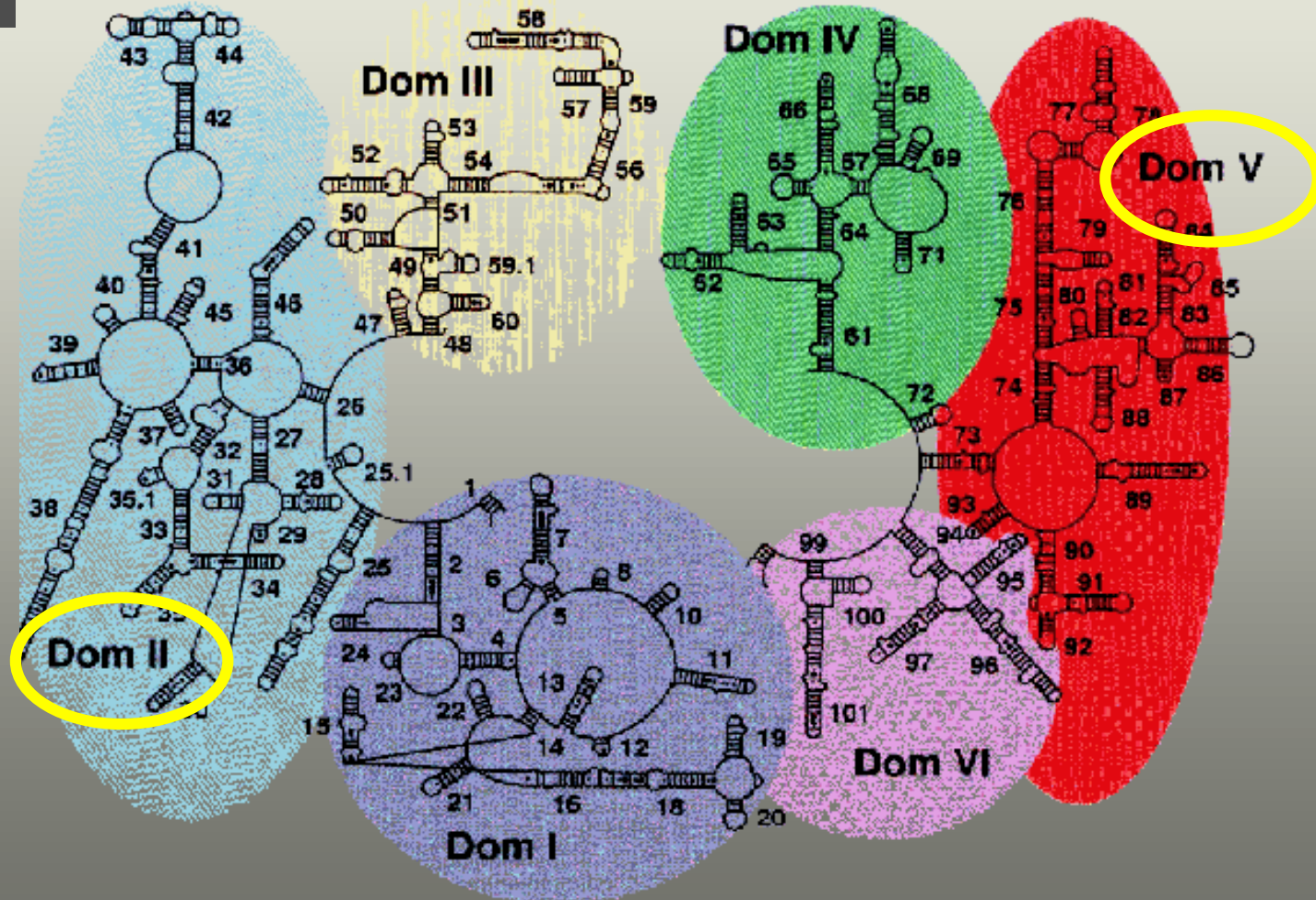
**INIBIZIONE DELLA SINTESI PROTEICA REVERSIBILE
PER LEGAME ALLA SUBUNITA' 50S (interagiscono con
il 23S rRNA) E BLOCCO DEL COMPLESSO tRNA-
aminoacido.**

BATTERIOSTATICI

Come agiscono?

Si legano al dominio II e V del 23S rRNA

Inibiscono la traslocazione ed il rilascio del tRNA.



MACROLIDI

RESISTENZA

1. MODIFICAZIONE DEL BERSAGLIO

la piu' frequente (plasmidica-inducibile) PER
METILAZIONE DELL'ADENINA DEL 23S rRNA

2. MODIFICAZIONE DELLA PERMEABILITA'

3. INATTIVAZIONE ENZIMATICA **RARA**

CHINOLONI

MECCANISMO D'AZIONE

**INIBIZIONE DELLA REPLICAZIONE DEL DNA
BATTERICO.**

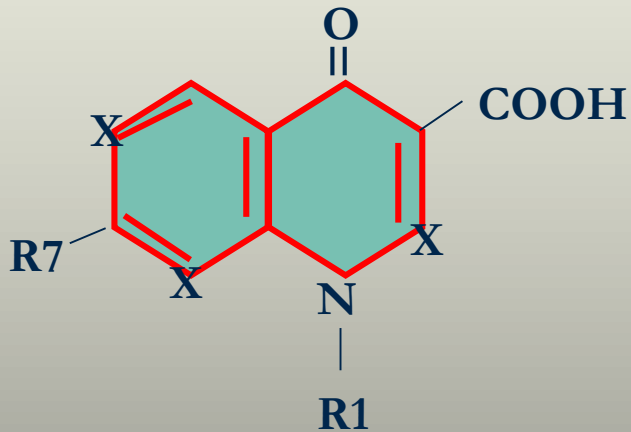
PRINCIPALI BERSAGLI SONO:

- **LA TOPOISOMERASI IV NEI GRAM+**
- **LA DNA GIRASI NEI GRAM-**

**QUESTI ENZIMI SONO ESSENZIALI PER TUTTI I
FENOMENI DI RICONFIGURAZIONE DEL GENOMA**

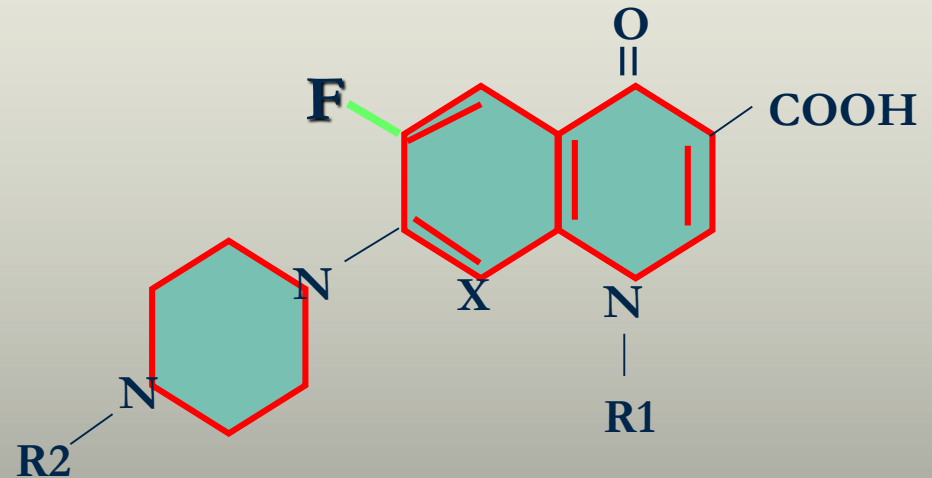
BATTERICIDI

CHINOLONI



CHINOLONI

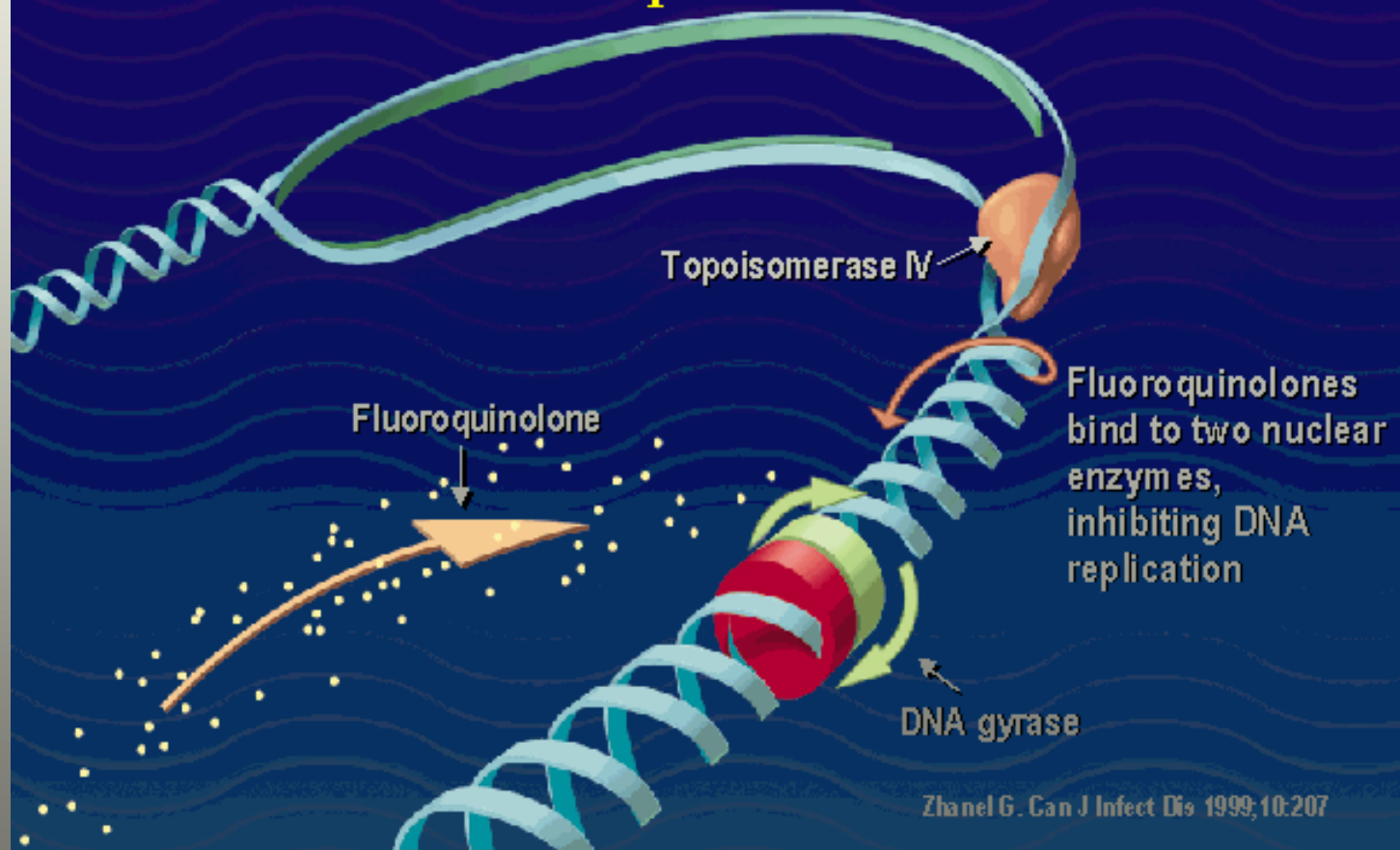
AC. NALIDIXICO
AC. PIPEMIDICO
CINOXACINA



FLUOROCHINOLONI

NORFLOXACINA
LEVOFLOXACINA
OFLOXACINA
CIPROFLOXACINA

Mechanism of Action of Fluoroquinolones



CHINOLONI

RESISTENZA

1. MUTAZIONI BERSAGLIO

2. RIDOTTA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE

- EFFLUSSO ATTIVO
- RIDOTTA PERMEABILITA'

Mechanisms of Resistance to Fluoroquinolones

- Efflux pump is a less potent and less common cause of resistance

Efflux pump →

2

Cell wall

1

Mutation of bacterial genes for binding sites causes resistance

DNA →

