



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Titolo: “ Meccanismi e rilevanza clinica dell'eteroresistenza batterica ”
“ Mechanism and clinical relevance of bacterial heteroresistance ”

Corso di laurea : Scienze Biologiche

Anno Accademico: 2019-2020

Tesi di Laurea di:

Maria Cannarsa

Docente Referente

Chiar.mo Prof. :

Francesca Biavasco

ETERORESISTENZA

- “ Presenza in una popolazione batterica di una o più sottopopolazioni le quali mostrano un livello di antibiotico resistenza più elevato rispetto alla popolazione principale”;
- Fu descritta per la prima volta nel 1940.

FATTORI DA CONSIDERARE:

1. Origine

```
graph LR; A[1. Origine] -.- B[Diversi cloni co-infettanti]; A -.- C[Rari mutanti spontanei];
```

Diversi cloni co-
infettanti

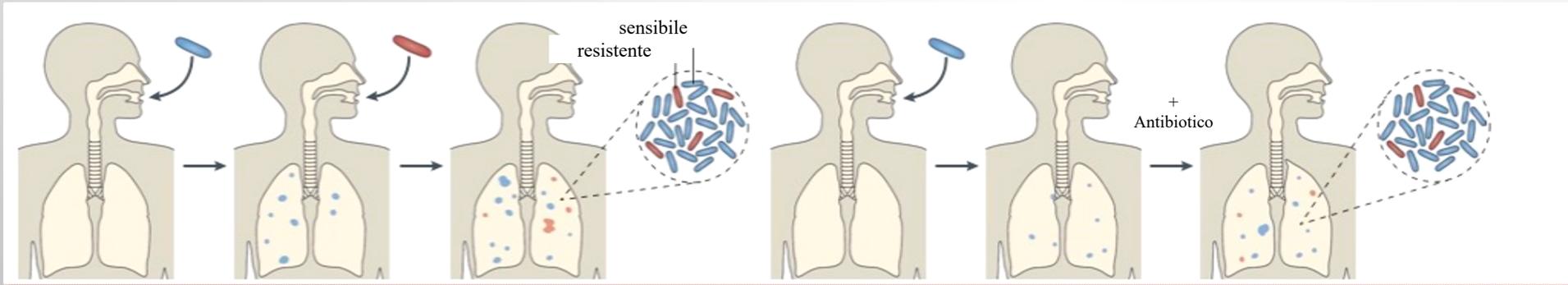
Rari mutanti spontanei

2. Clonalità

Etero-resistenza policlonale

Infezione mista

Rari mutanti resistenti che lentamente prevalgono sulla popolazione nel corso del trattamento antibiotico.



Infezione iniziale in un isolato sensibile.

Infezione secondaria causa di un isolato resistente

Infezione causata da una combinazione di batteri sensibili e resistenti.

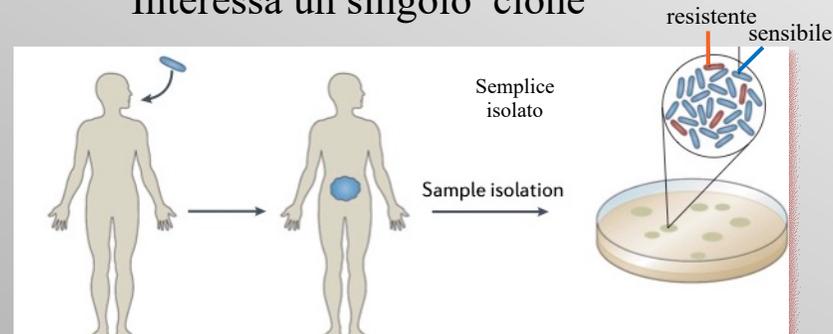
Infezione causata da un isolato sensibile.

Insorgenza spontanea di una mutazione resistente.

Una porzione di batteri resistenti cresce sotto la pressione antibiotica, ciò ha come esito un'infezione mista di batteri sensibili e resistenti.

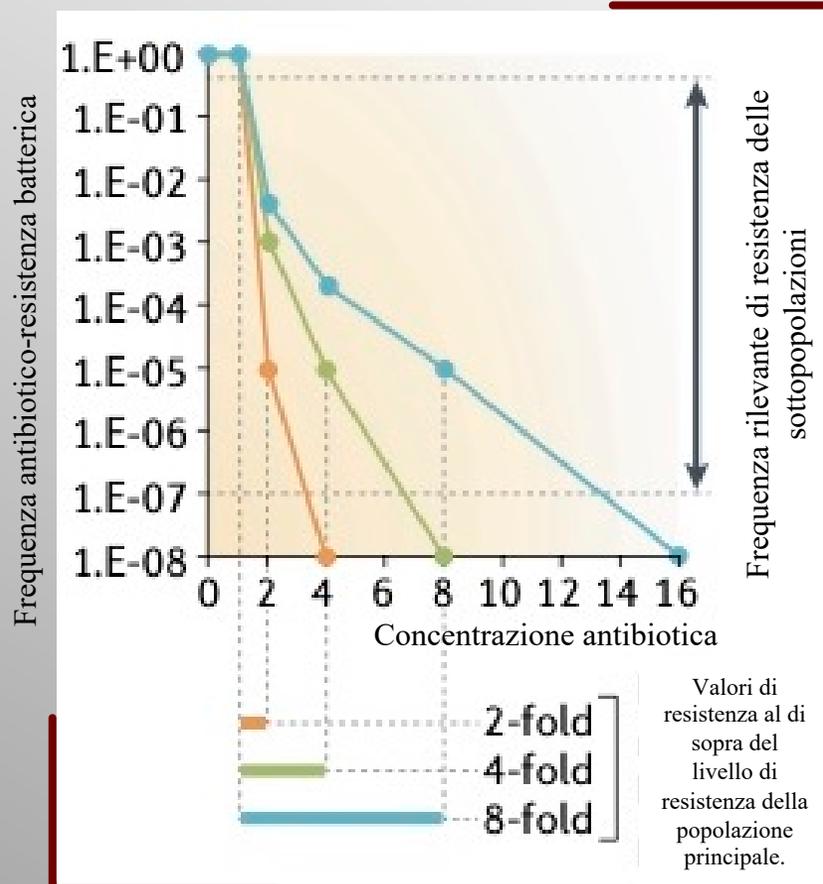
Etero-resistenza monoclonale:

Interessa un singolo clone

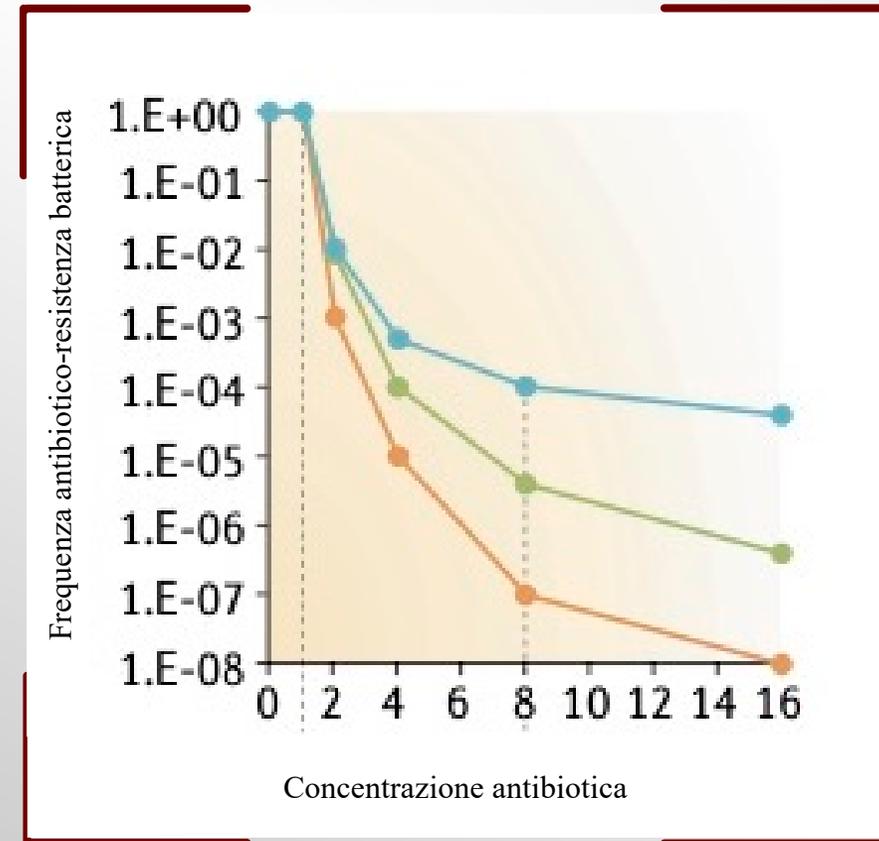


Cloni puri spesso contengono sottopopolazioni batteriche resistenti.

3. Livello di resistenza delle sottopopolazioni



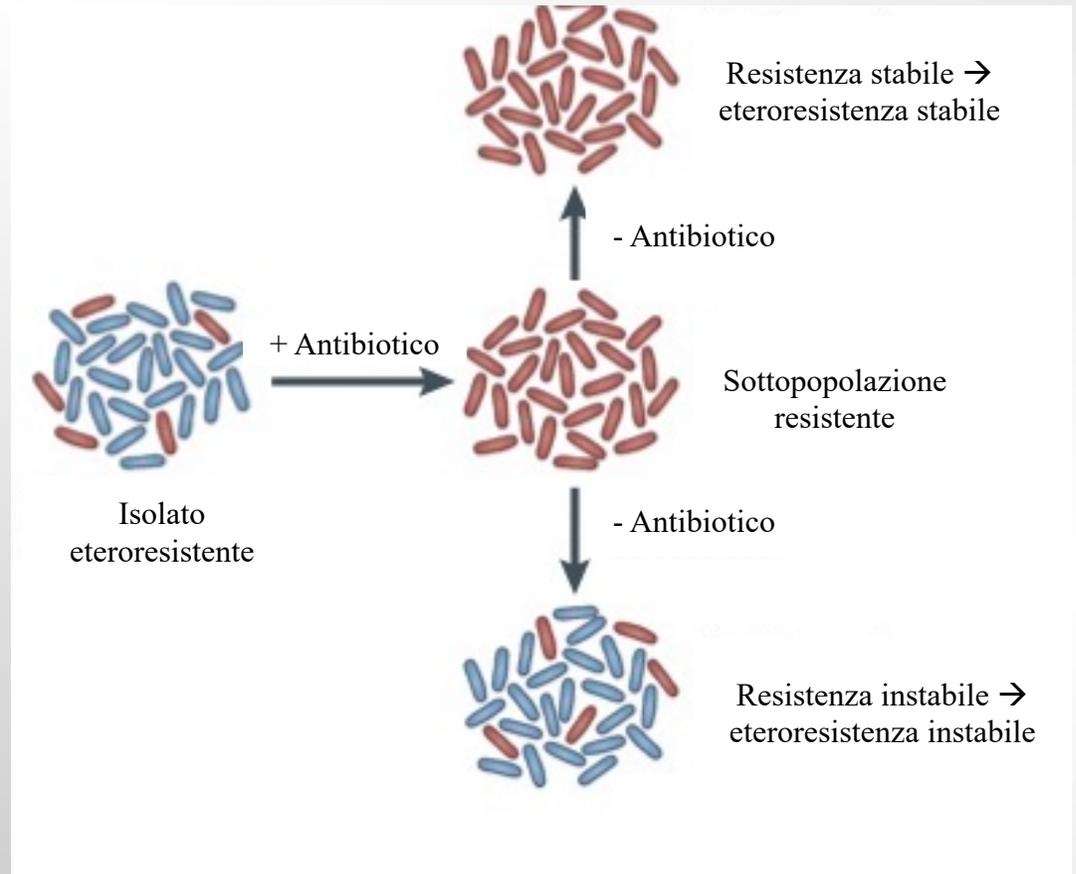
4. Frequenza delle sottopopolazioni resistenti



5. Breakpoint:

concentrazione di antibiotico
che definisce se il ceppo
batterico in esame è sensibile
o resistente

6. Stabilità



L'INSTABILITÀ È CAUSATA DA:

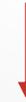


- Mutazioni resistenti (delezioni, inserzioni...)



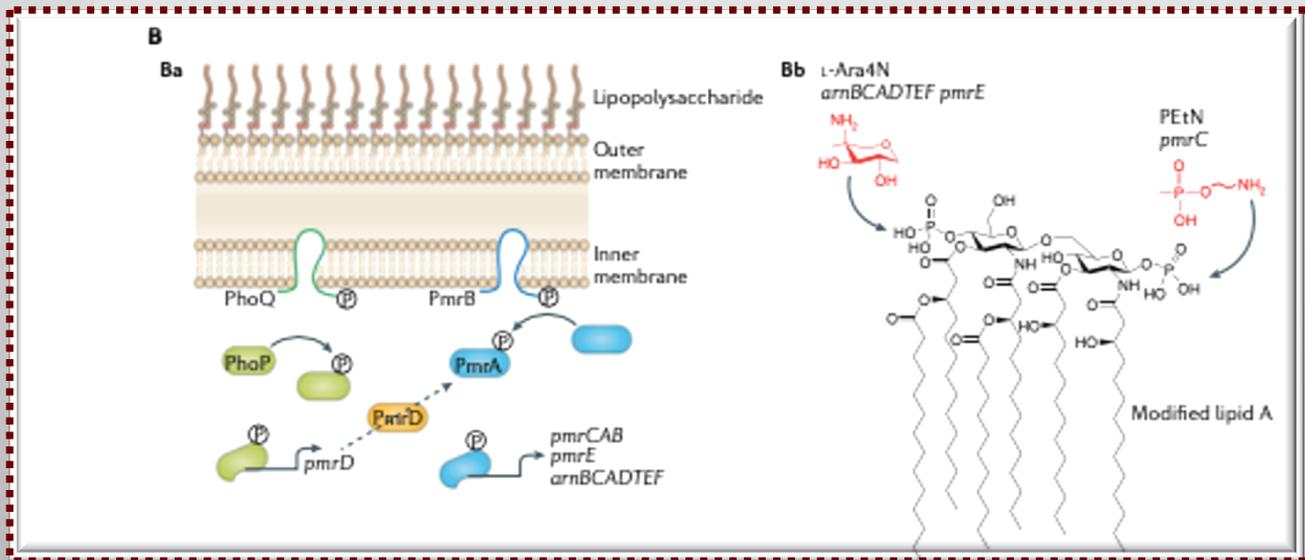
Un elevato costo di fitness
rappresenta il principale fattore di inversione
del fenotipo durante la crescita in assenza di antibiotici,
anche se può essere
ridotto da mutazioni compensatorie

Amplificazioni geniche in tandem



Comporta un'instabilità intrinseca.
Infatti, le amplificazioni in tandem sono
instabili e pertanto in assenza di antibiotico
vengono perse facilmente

ETERORESISTENZA MONOCLONALE GENERATA DA AMPLIFICAZIONI IN TANDEM DI UN GENE



Eteroresistenza (instabile) alla colistina in *S. Typhimurium* basata sull'amplificazione genica descritta

- Il tasso di formazione e di delezione delle duplicazioni spontanee è elevato; i geni amplificati vengono persi velocemente a causa di crossing-over ineguali
- Se queste regioni codificano per resistenze il cui livello è correlato al numero di copie del gene aumentando il numero di geni aumenta il livello di resistenza.
- Eteroresistenza instabile → reversibile → elevato costo di fitness.

Eteroresistenza dovuta a amplificazioni geniche

Su 41 isolati provenienti da 4 specie di Gram-negativi sono stati testati 28 antibiotici:

- delle 766 combinazioni batterio-antibiotico saggiate il 27,4% ha mostrato eteroresistenza;
- di queste l'88% ha mostrato un fenotipo eteroresistente instabile con una prevalenza (61%) di eventi di amplificazioni genica;
- La frequenza di mutanti con amplificazioni è risultata in media $4,9 \times 10^{-6}$

DEFINIZIONE DI ETERORESISTENZA

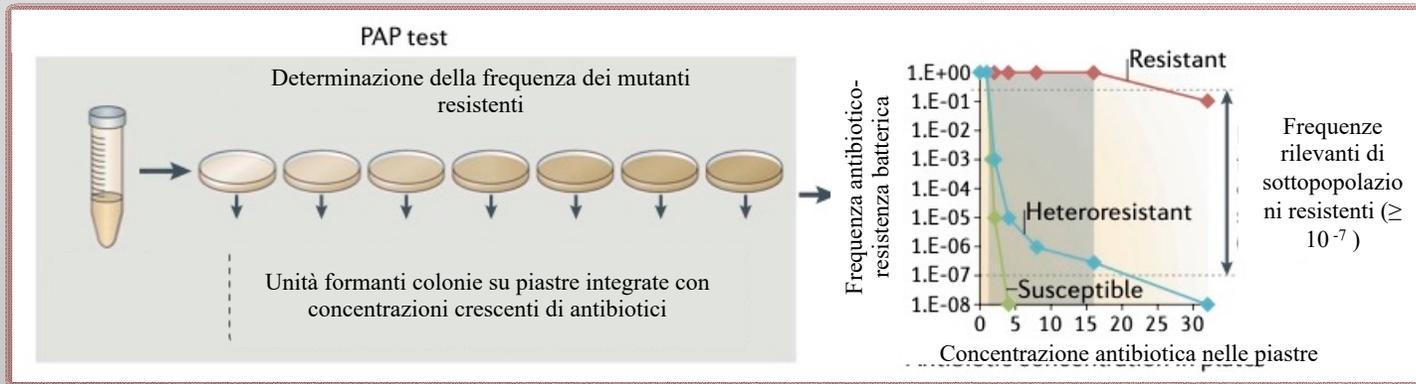
basata sulla rilevanza clinica

Per rispondere a domande circa la frequenza minima delle sottopopolazioni resistenti e il livello minimo di resistenza che possono determinare il fallimento del trattamento antibiotico.

«Eteroresistenza= presenza di una sottopopolazione di cellule con una MIC almeno 8 volte superiore alla più alta concentrazione del farmaco che non influisce sulla crescita della popolazione sensibile»

(Valvano e El-Halfawy in Eteorresistenza antimicrobica: un campo emergente che ha bisogno di chiarezza; pubblicato da Clinical Microbiology Reviews nel 2015).

METODI PER RILEVARE L'ETERORESISTENZA:



- PAP test (analisi del profilo di popolazione) → metodo più affidabile, ma molto elaborato;
- E-test;
- PCR

Complicazioni nella rilevazione dell'eteroresistenza sono dovute all'effetto inoculo.

ETERORESISTENZA IN ISOLATI CLINICI

- frequente isolamento di *Staphylococcus aureus* con sensibilità intermedia alla vancomicina e fenotipo eteroresistente (hVISA); 6% di 99 isolati (Zhang et al, 2015);
- aumento progressivo di hVISA nel periodo 2006-2014;
- il genere *Staphylococcus* è anche eteroresistente alla teicoplanina e soprattutto all'oxacillina (maggiore prevalenza dell'eteroresistenza rispetto all'hVISA)



Co-eteroresistenza: eteroresistenza nei confronti di più di un antibiotico
es. hVISA e eteroresistenza alla teicoplanina

ETERORESISTENZA E FALLIMENTO DEL TRATTAMENTO ANTIBIOTICO

- Rilevazione fenotipo eteroresistente → corretta scelta dell'antibiotico;
 - diversi studi hanno correlato l'hVISA a batteriemie persistenti;
- es. esperimenti sui topi hanno mostrato che l'eteroresistenza alla colistina può portare al fallimento del trattamento; si è visto infatti che la frequenza delle sotto popolazioni resistenti alla colistina era più alta nei topi in assenza di pressione antibiotica → ciò dipende dalla risposta immunitaria precoce → correlazione con il sistema a due componenti di PhoPQ.

CONCLUSIONI

“ ETERORESISTENZA ANTIMICROBICA: UN CAMPO EMERGENTE CHE HA BISOGNO DI CHIAREZZA” El-Halfawy e Valvano 2015.

Ad oggi è chiaro che:

- l'eteroresistenza rappresenta un problema clinico;
- frequenze di eteroresistenza comprese tra 10^{-2} e 10^{-6} spesso portano al fallimento della terapia;
- è necessario mettere a punto un metodo standard per identificare l'eteroresistenza nei laboratori di microbiologia clinica.

Riassunto

L'eteroresistenza agli antibiotici è un particolare fenotipo caratterizzato dalla produzione, da parte di un singolo isolato batterico, di sottopopolazioni di cellule che mostrano una sostanziale riduzione della sensibilità al farmaco rispetto alla popolazione principale. Recenti ricerche indicano che questo fenomeno è molto comune e riguarda diverse specie batteriche e classi di antibiotici.

Il fenotipo di resistenza è spesso instabile e in assenza di pressione antibiotica ritorna rapidamente a quelle sensibili; alla base di questa reversione potrebbero esserci amplificazioni in tandem instabili di geni coinvolti nella resistenza .

L'instabilità, la bassa frequenza e il carattere transiente delle sottopopolazioni resistenti ne rende difficile l'individuazione e lo studio, con conseguenti notevoli difficoltà a classificare gli isolati batterici come sensibili o resistenti.

Infine, diversi studi hanno dimostrato un incremento delle sottopopolazioni resistenti durante l'esposizione agli antibiotici; e un sempre maggior numero di osservazioni suggeriscono che l'eteroresistenza possa portare al fallimento terapeutico.

Grazie per l'attenzione.

