



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

CORSO DI LAUREA SCIENZE BIOLOGICHE

Batteri sotto attacco antibiotico: diverse strategie di adattamento evolutivo

Bacteria under antibiotic attack: different strategies for evolutionary adaptation

Tesi di Laurea di
Sciriscioli Margherita

Docente referente
Giovanetti Eleonora

Sessione autunnale (dicembre)

Anno Accademico 2020/2021

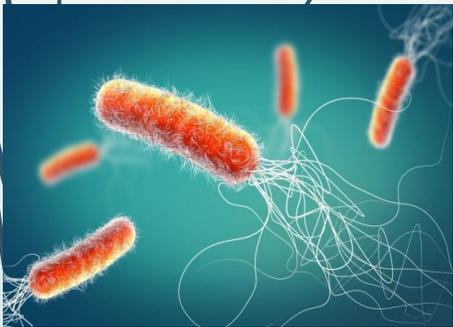
INTRODUZIONE

I batteri sono noti per la loro capacità di evolvere e adattarsi a cambiamenti ambientali, grazie all'elevata plasticità dei loro genomi e allo scambio di informazioni genetiche (HGT).

Questa elevata adattabilità è testimoniata anche dalla **sempre minore efficacia delle terapie antibiotiche**.

- Molti batteri patogeni si dimostrano tolleranti o pienamente resistenti agli antibiotici, ciò comporta la mancata eradicazione dell'infezione o il prolungamento della terapia.

Pertanto risulta fondamentale comprendere **l'evoluzione delle strategie batteriche per superare lo stress antibiotico** e l'identificazione delle condizioni di trattamento ottimali per ostacolare l'insorgenza di fenomeni di resistenza e di tolleranza agli antibiotici.



Pseudomonas aeruginosa
Patogeno «ESKAPE» (MDR)

Immagine tratta da Focus.it
https://www.focus.it/images/2021/06/23/pseudomonas-aeruginosa_w630.jpg

STRATEGIE DI SOPRAVVIVENZA AGLI ANTIBIOTICI NELLE POPOLAZIONI BATTERICHE: RESISTENZA E TOLLERANZA.



E-test

Immagine tratta da Mediray
<https://www.mediray.co.nz/media/16569/etest-range.png?height=400&width=400&mode=boxpad&bgcolor=fff>

La **resistenza** può essere conferita da: (i) mutazioni ex novo in geni strutturali o regolatori e trasmissibili verticalmente; (ii) meccanismi di HGT grazie ad elementi genetici mobili.

La determinazione della **MIC** «*minimum inhibitory concentration*» di un antibiotico è utilizzata per valutare se un batterio è sensibile o resistente a quell'antibiotico.

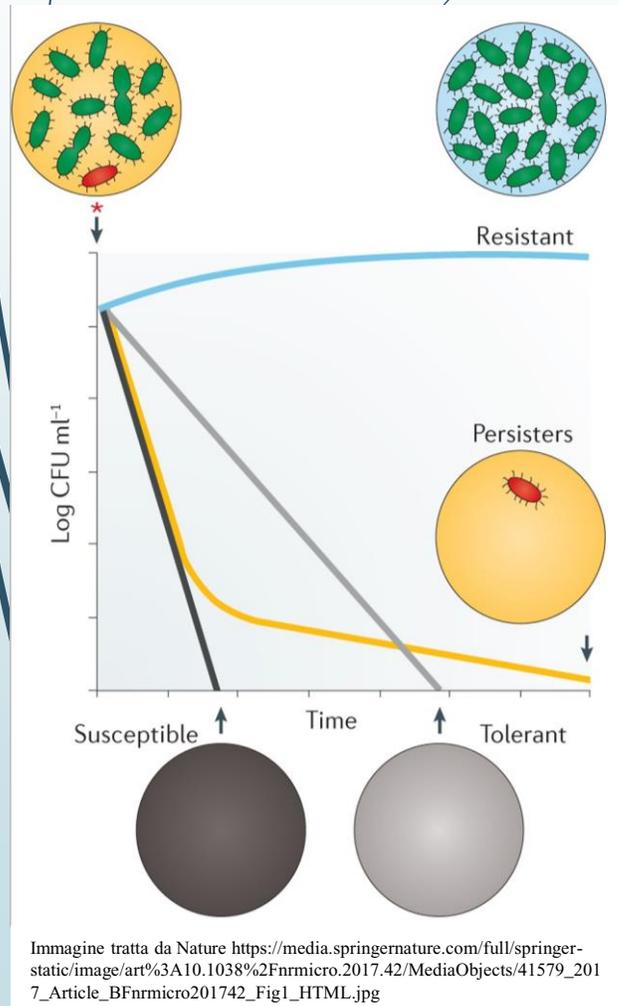
Mutanti resistenti sono in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di antibiotico più elevate rispetto al ceppo wild-type.



Test di Kirby Bauer

Immagine tratta da Nurse24.it
<https://cloud2.nurse24.it/images/antibiogramma2.jpg>

Tuttavia, anche popolazioni con un valore di MIC di antibiotico basso, possono sopravvivere all'attività antimicrobica grazie al fenomeno della tolleranza.



Le cellule tolleranti differiscono da quelle sensibili solo dal punto di vista fenotipico e, se costituiscono una frazione della popolazione, si parla di cellule persistenti.

A differenza della resistenza, la tolleranza dipende debolmente dalla concentrazione di antibiotico applicata.

Un indicatore del livello di tolleranza ad elevate concentrazioni di antibiotico è la **MDK** «*minimum duration for killing*».

Durante un trattamento antibiotico, anche a dosaggi elevati, le cellule tolleranti sopravvivono più a lungo delle cellule sensibili, ma non si replicano.

EVOLUZIONE DELLA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Resistenza a basso livello → si sviluppa esponendo i batteri a una concentrazione costante di antibiotico.

Resistenza ad alto livello → si sviluppa esponendo gradualmente i batteri a concentrazioni crescenti di antibiotico.

Concentrazione di antibiotico > MIC delle cellule sensibili

- Selezione dei mutanti resistenti preesistenti
- Completa inibizione delle cellule sensibili
- Vantaggio di crescita dei mutanti resistenti
- Formazione di una popolazione resistente

Se nella popolazione originale non fossero presenti batteri resistenti, l'infezione risulterebbe eradicata.

Concentrazione di antibiotico << MIC delle cellule sensibili

- Selezione non letale
- Incremento del tasso di mutazione
- Incremento della variabilità genetica della popolazione

L'esposizione a concentrazioni sub-inibitorie di antibiotico favorisce l'insorgenza di mutazioni in grado di conferire resistenza (arricchimento di mutanti resistenti).

Concentrazione di antibiotico > MPC «mutant prevention concentration»
→ inibisce i mutanti resistenti e ne previene la selezione.



Evoluzione sperimentale: consente di studiare l'evoluzione della resistenza agli antibiotici conferita da mutazioni ex novo.

L'evoluzione della resistenza agli antibiotici in un paziente è influenzata da diversi fattori, difficili da monitorare in laboratorio (HGT, interazioni intra/inter-specifiche, condizioni ambientali...).

L'acquisizione della resistenza è spesso associata a un costo di fitness

Costi e benefici della resistenza

In presenza di antibiotico

- I mutanti resistenti saranno favoriti dall'insensibilità all'antibiotico e potranno proliferare in una condizione di diminuita competizione.

In assenza di antibiotico

- Il «fitness cost» della resistenza, osservato come un ridotto tasso di crescita, determinerà una maggiore competizione delle cellule sensibili con i mutanti resistenti.

EVOLUZIONE DELLA TOLLERANZA AGLI ANTIBIOTICI

L'esposizione periodica ad elevate dosi di antibiotico favorisce l'evoluzione della tolleranza.

La percentuale di cellule persistenti in una popolazione batterica aumenta all'aumentare della frequenza del trattamento.



La tolleranza è conferita da una **fase di latenza maggiore**, protettiva contro l'antibiotico.

In assenza di antibiotici le cellule tolleranti crescono più lentamente di quelle sensibili («*Fitness cost*» della tolleranza).

RESISTENZA E TOLLERANZA: VIE ALTERNATIVE PER LA SOPRAVVIVENZA AGLI ANTIBIOTICI?

Sono considerate strategie di sopravvivenza alternative che forniscono un vantaggio alle popolazioni batteriche frequentemente esposte a stress antibiotico.

A seconda delle condizioni, la strategia più vantaggiosa può essere la **TOLLERANZA o la **RESISTENZA**.**

L'evoluzione della tolleranza è favorita in presenza di:

- Concentrazione di antibiotico elevata.
- Condizioni che limitano la crescita (bassa concentrazione di nutrienti).

L'evoluzione della resistenza è favorita in presenza di:

- Concentrazione di antibiotico non elevata.
- Condizioni che promuovono la crescita (elevata concentrazione di nutrienti).

Correlazione positiva tra **TOLLERANZA** e probabilità di evoluzione della **RESISTENZA**.

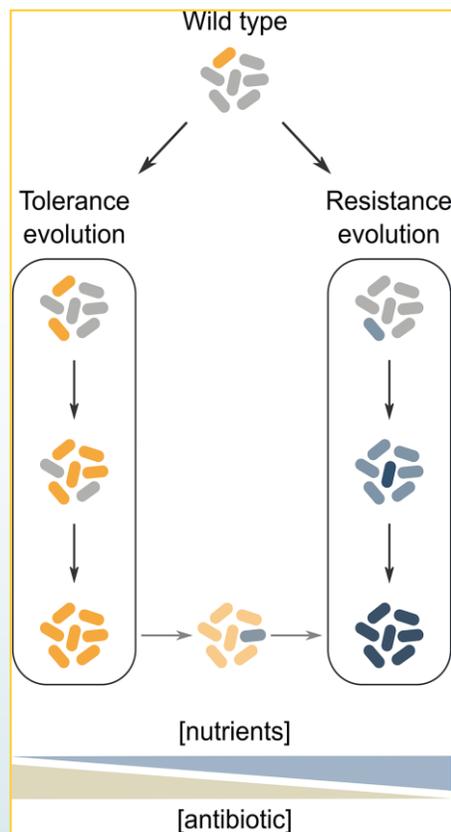


Immagine tratta dall'articolo: "Bacteria under antibiotic attack: different strategies for evolutionary adaptation".
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008431.g001>

In condizioni favorevoli all'evoluzione della resistenza, un ceppo tollerante sviluppa resistenza più rapidamente di un ceppo selvaggio.

Poiché la probabilità di sopravvivenza di un microrganismo tollerante è più elevata sarà maggiore sia la possibilità di acquisire mutazioni di resistenza che la loro successiva diffusione nella popolazione.

I tessuti ospiti sono eterogenei e complessi e, le sottopopolazioni di patogeni, nei diversi microambienti, rispondono a specifiche condizioni locali (differenti concentrazioni di antibiotico e nutrienti, diverse tipologie cellulari, presenza di cellule immunitarie, specifiche proprietà chimico/fisiche...).

Questo complica notevolmente l'estrapolazione delle osservazioni in vitro alle condizioni di evoluzione delle popolazioni batteriche in vivo.

ABSTRACT

Le popolazioni batteriche possono dimostrarsi refrattarie a un trattamento antibiotico a causa dell'insorgenza di meccanismi di resistenza o di tolleranza.

La resistenza è conferita da modificazioni genetiche che consentono ai batteri di moltiplicarsi a concentrazioni di antibiotico che risultano letali per il ceppo wild-type. Pertanto, la MIC di antibiotico richiesta per inibire la crescita dei resistenti è più elevata rispetto a quella richiesta per inibire la crescita delle cellule sensibili.

Esponendo una popolazione batterica a una concentrazione di antibiotico superiore alla MIC delle cellule sensibili e inferiore alla MPC (*mutant prevention concentration*) verranno selezionati, se presenti, i mutanti resistenti preesistenti, con conseguente sviluppo di una popolazione resistente. L'esposizione a concentrazioni di antibiotico sub-MIC può determinare un incremento del tasso di mutazione favorendo l'evoluzione delle cellule sensibili in resistenti.

Grazie al fenomeno della tolleranza, popolazioni batteriche con un basso valore di MIC di antibiotico, pur non replicando, possono sopravvivere a concentrazioni elevate di farmaco.

La tolleranza, a differenza della resistenza, dipende debolmente dalla concentrazione di antibiotico applicata ed è quantificata in base alla MDK (*minimum duration for killing*). Durante un trattamento antibiotico le cellule tolleranti sopravvivono più a lungo di quelle sensibili, a causa di un aumento della durata della fase di latenza. Di conseguenza saranno favorite in presenza dell'antimicrobico, ma mostreranno una riduzione della fitness, rispetto alle cellule sensibili, in condizioni favorevoli alla crescita.

Esponendo ripetutamente una popolazione batterica a elevate concentrazioni di antibiotico, e in condizioni di scarsità di nutrienti, si osserva un aumento della percentuale di cellule persistenti. Inoltre, in condizioni favorevoli all'evoluzione della resistenza, un ceppo tollerante sviluppa resistenza con maggiore probabilità rispetto ad un ceppo wild-type. Dal momento che in condizioni avverse le cellule tolleranti hanno maggiore probabilità di sopravvivenza, esse acquisiranno mutazioni in grado di conferire resistenza che diffonderanno nella popolazione con più facilità.

Approcci sperimentali nello studio dell'evoluzione possono fornire una base importante per prevedere l'adattamento batterico allo stress antibiotico nel paziente e prevenire lo sviluppo di meccanismi di resistenza e di tolleranza.

Tuttavia, data la complessità e l'eterogeneità degli ambienti in vivo, anche altri parametri, oltre alle condizioni di trattamento antibiotico e alla concentrazione locale di nutrienti, possono giocare un ruolo fondamentale nell'evoluzione dei batteri durante un'infezione, influenzando l'efficacia di una terapia. Questi studi si avvalgono di esperimenti di evoluzione in laboratorio che mimano l'adattamento batterico durante una terapia antibiotica, consentendo l'osservazione in tempo reale dei cambiamenti evolutivi e la ricostruzione dettagliata delle dinamiche mutazionali.