

Paolo Fazii
U.O.C. di Microbiologia e Virologia Clinica
P.O. "Spirito Santo" - Pescara



Storia e prospettiva della resistenza ai farmaci antibatterici

Bertinoro (CF)
27 Novembre 2019

Introduzione

P. Fazii



MULTI-DRUG RESISTANT ORGANISMS (MDRO)



MRSA

Klebsiella (KPC)

CRE

Resistant Pseudomonas

CARBAPENEM RESISTANT ACINETOBACTER

VRE

ESBL

C. difficile



► Il fenomeno **della resistenza** batterica ai chemioterapici antibatterici (**antibiotici**) è un evento **sempre più frequente ed allarmante**.

► Il **problema** microbiologico ed infettivologico **oggi più importante** è, senza dubbio, la comparsa di un **numero oramai già difficilmente gestibile** di casi di **infezioni da MDRO** (Multi Drug Resistant Organism) appartenenti a diversi **generi di microrganismi**, (batterici, fungini, protozoari e virali) ed in generale la **problematica MDRO** sia a **livello:**

-**ambientale**

-che **animale**

-che, soprattutto, **umano**

Introduzione

P. Fazii



► La **resistenza antimicrobica** rappresenta una sfida importante sia **nell'UE** che a **livello globale**.

► La resistenza antimicrobica rappresenta già ora un **pesante onere sociale ed economico**: si stima che ad essa siano riconducibili **25 000 decessi l'anno nella sola UE** e 700 000 decessi l'anno in tutto il mondo.

► **L'inazione potrebbe** causare milioni di decessi a livello globale: secondo le stime, **entro il 2050** la **resistenza antimicrobica** potrebbe provocare **più decessi del cancro**

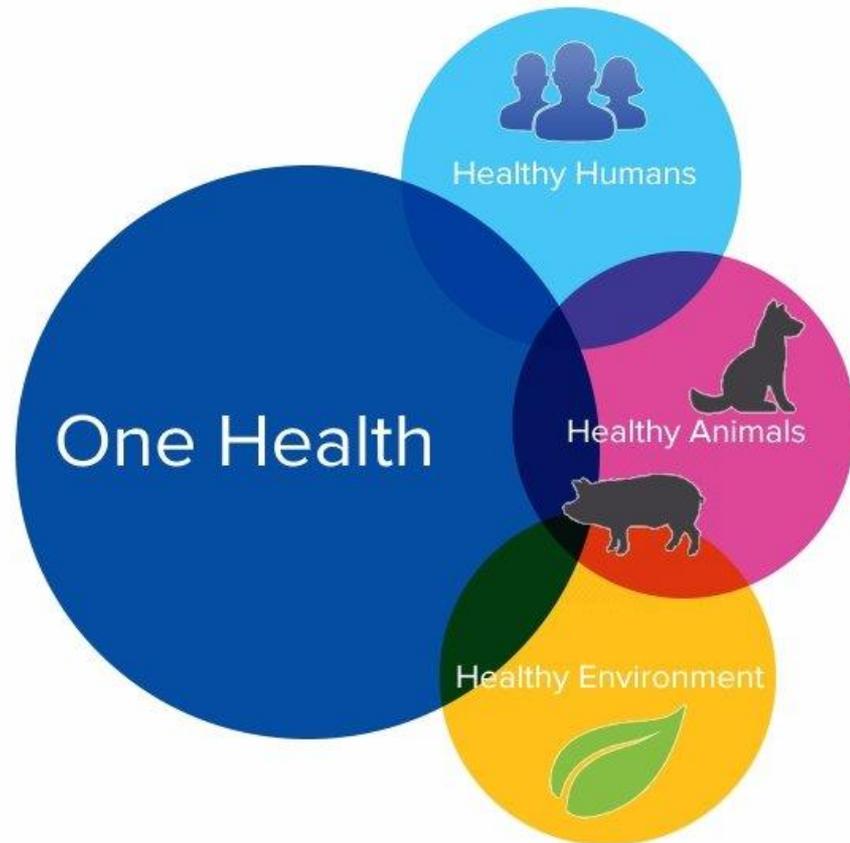
► Come dimostra la **strategia comunitaria del 2001** contro la resistenza agli agenti antimicrobici **l'UE** ha prontamente riconosciuto l'importanza di affrontare il fenomeno. **Tale politica è stata rafforzata dal piano d'azione del 2011 della Commissione**, caratterizzata **dall'approccio "One Health"**, nell'ambito del quale la resistenza antimicrobica viene affrontata sia **nell'uomo** che **negli animali**.



Introduzione

► Il presente nuovo piano d'azione "One Health" contro la resistenza antimicrobica è motivato dalla necessità che l'UE svolga un ruolo chiave nella lotta al fenomeno e aggiunga valore alle azioni degli Stati membri.

► Obiettivo generale del piano è mantenere la possibilità di curare efficacemente le infezioni nell'uomo e negli animali.



Introduzione

P. Fazii



Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020



#EUAMRaction

► AZIONI PREVISTE A LIVELLO REGIONALE

- a. **Identificazione** di un **referente regionale** per il **contrasto dell'AMR**, responsabile del **coordinamento**, dell'implementazione e del monitoraggio del Piano a livello regionale (entro 6 mesi dall'approvazione del Piano)
- b. **Istituzione** di un **Gruppo tecnico** regionale di coordinamento e **monitoraggio del Piano e della Strategia** di contrasto dell'AMR a livello regionale, che **include i referenti** delle diverse componenti operative del Piano stesso, che sia **coordinato dal referente regionale del Piano** e sia **responsabile di informare sullo stato di avanzamento le istituzioni competenti** (entro 6 mesi dall'approvazione del Piano)
- c. **Recepimento** dei **documenti emanati** a livello nazionale
- d. **Identificazione** delle **modalità di implementazione** delle azioni di piano a livello regionale
- e. **Costruzione** del sistema di **monitoraggio regionale** (entro il 2018).
- f. **Partecipazione** alla **predisposizione delle linee strategiche** e dei documenti attuativi nazionali

► INDICATORI LIVELLO REGIONALE

1. **Identificazione** di un **referente regionale** per il **contrasto dell'AMR**
2. **Istituzione** di un **Gruppo tecnico** regionale di **coordinamento e monitoraggio**
3. **Disponibilità di rapporti annuali** di monitoraggio del piano (2020)
4. **Documento regionale annuale** di **individuazione delle azioni efficaci** a contrastare i problemi rilevati a livello regionale e di promozione dell'inter-settorialità degli interventi (dal 2020)


Conferenza del Consiglio dei Presidenti
CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI
TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME
DI TRENTO E DI BOLZANO

Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 13, tra le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento "Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020".

Rep. Atti n. 198 del 2 novembre 2017



REGIONE
ABRUZZO



Introduzione

► Due categorie di Resistenza agli antibiotici.

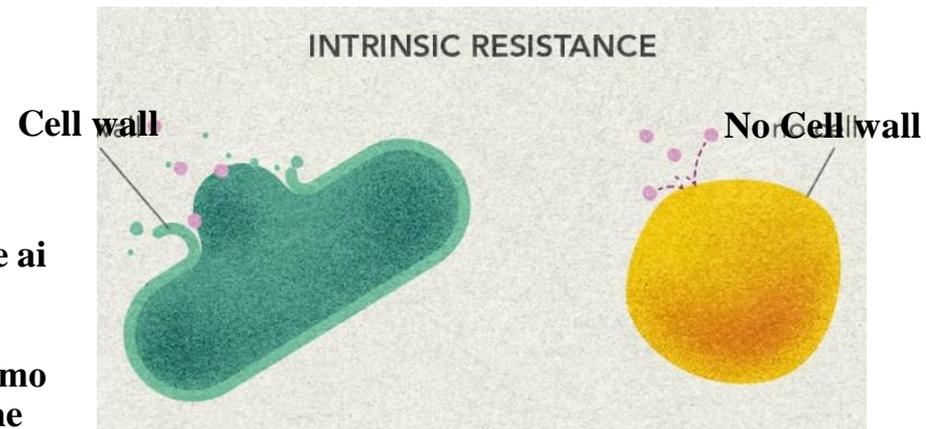
A) Resistenza naturale o primaria o intrinseca

B) Resistenza acquisita

A) Resistenza naturale o primaria o intrinseca

Insensibilità costituzionale di un **microrganismo** Vs un **determinato antibiotico** dipendente da:

- 1) **Meccanismo** d'azione del **farmaco** e **struttura del microrganismo** (es. *Mycoplasma pneumoniae* insensibile ai beta-lattamici)
- 2) **Mancata penetrazione** dell'antibiotico nel microrganismo (es. insensibilità di *Escherichia coli* alla **Penicillina G** che non attraversa la membrana esterna)
- 3) **Mancanza del legame** dell'antibiotico con il suo specifico bersaglio (es. resistenza di *Staphylococcus aureus* all'**Aztreonam** per **inaccessibilità** dello stesso alle **PBP**)



Introduzione

Intrinsic Antibiotic Resistance in Gram Negative Bacteria

Bacterial pathogen that are Intrinsically resistance to Ampicillin

Acinetobacter baumannii complex

Citrobacter freundii

Citrobacter koseri

Enterobacter aerogenes

Enterobacter cloacae complex

Klebsiella pneumoniae

Morganella morganii

Proteus vulgaris

Pseudomonas aeruginosa

Serratia marcescens

Yersinia enterocolitica

Bacterial pathogens that are Intrinsically Resistant to Amoxicillin-Clavulanate combination

Citrobacter freundii

Enterobacter aerogenes

Enterobacter cloacae complex

Morganella morganii

Pseudomonas aeruginosa

Serratia marcescens

Yersinia enterocolitica

Bacterial pathogens that are Intrinsically Resistant to Ampicillin-sulbactam combination

Acinetobacter baumannii complex

Citrobacter freundii

Citrobacter koseri

Enterobacter aerogenes

Enterobacter cloacae complex

Proteus vulgaris

Pseudomonas aeruginosa

Serratia marcescens

Citrobacter koseri is intrinsically resistant to Piperacillin

whereas *Proteus* spp is intrinsically resistant to Tetracycline/Tigecycline,

Nitrofurantoin and Polymyxin B Colistin

Introduzione

Intrinsic Antibiotic Resistance in Gram Negative Bacteria

Acinetobacter baumannii complex is notorious pathogen which is resistant to most of the available antibiotics. It is intrinsically resistant to

*Ampicillin, Amoxicillin
Ampicillin-sulbactam
Aztreonam
Ertapenem
Trimethoprim
Chloramphenicol*

Bacteroides spp. which is one of the most frequently isolated anaerobic Gram negative bacilli is intrinsically resistant to

*Aminoglycosides
Penicillin and
Ampicillin*

Similarly Pseudomonas aeruginosa is intrinsically resistant to

*Ampicillin, Amoxicillin
Ampicillin-sulbactam
Amoxicillin-Clavulanate
Cefotaxime
Ceftriaxone
Ertapenem
Tetracyclines/Tigecyclines
Trimethoprim
Trimethoprim-sulfamethoxazole
Chloramphenicol*

Both Acinetobacter and Pseudomonas are also intrinsically resistant to penicillin (ie, benzylpenicillin), cephalosporin I (cephalothin, cefazolin), cephalosporin II (cefuroxime), cephamycins (cefoxitin, cefotetan), clindamycin, daptomycin, fusidic acid, glycopeptides (vancomycin, teicoplanin), linezolid, macrolides (erythromycin, azithromycin, clarithromycin), quinupristin-dalfopristin, and rifampin.

Introduzione

Intrinsic Antibiotic Resistance in Gram Positive Bacteria

Intrinsic Antibiotic Resistance in Gram Positive Bacteria

*Among gram positive bacteria, **S. saprophyticus** is intrinsically resistance to Novobiocin which is the basis for **Novobiocin sensitivity test** done in urine isolate (if CONS is isolated).*

Enterococcus faecalis/faecium are intrinsically resistant to

*Cephalosporin**

*Aminoglycosides**

*Clindamycin**

Trimethoprim

*Trimethoprim-sulfamethoxazole**

Fusidic acid

**may appear active in vitro but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.*

Both Enterococci and Staphylococci are also intrinsically resistant to aztreonam, polymyxin B/colistin, and nalidixic acid.

Introduzione

B) Resistenza acquisita

sino a qualche anno orsono vi erano **due teorie** che si contrapponevano per spiegare l'AR:

- 1) **induzione diretta (teoria adattativa)**
adattamento fenotipico del microrganismo attraverso l'**attivazione** di enzimi **precedentemente repressi**
- 2) **mutazioni spontanee**
selezionate dall'antibiotico mediante una **pressione selettiva**

ad 1) e 2) si è aggiunto il 3) **genetic exchange** ovvero **scambio di materiale** genetico sia **cromosomico che extracromosomico** da un **microrganismo all'altro**, in maniera anche interspecifica (da una specie batterica all'altra)

3) **genetic exchange**

■ Tale trasporto si può attuare con diversi meccanismi:

- a) **trasformazione**
- b) **transduzione**
- c) **coniugazione**
- d) **transposizione**

THE
CHEMICAL KINETICS
OF THE
BACTERIAL CELL

BY
C. S. HINSHELWOOD, F.R.S.
OF THE UNIVERSITY OF CAMBRIDGE

PRINTED
AT THE UNIVERSITY PRESS
CAMBRIDGE

1) **induzione diretta (teoria adattativa)**

The **adaptation hypothesis** was championed by **Hinshelwood** who argued that, if a culture was grown in the **presence of an inhibitor**, the concentration of the substrate for the blocked reaction would accumulate and reverse the inhibition. Serial culturing in successively **higher concentrations** of a drug **was interpreted**, thus, as **“training” the culture to tolerate** the inhibition.

Introduzione

► B) Resistenza acquisita

sino a qualche anno orsono vi erano **due teorie** che si contrapponevano per spiegare l'AR:

- 1) **induzione diretta (teoria adattativa)**
adattamento fenotipico del microrganismo attraverso **l'attivazione di enzimi precedentemente repressi**
- 2) **mutazioni spontanee**
selezionate dall'antibiotico mediante una pressione selettiva

ad 1) e 2) si è aggiunto il 3) **genetic exchange** ovvero **scambio di materiale genetico sia cromosomico che extracromosomico da un microrganismo all'altro, in maniera anche interspecifica (da una specie batterica all'altra)**

3) *genetic exchange*

■ Tale trasporto si può attuare con diversi meccanismi:

- a) **trasformazione**
- b) **transduzione**
- c) **coniugazione**
- d) **transposizione**

REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS

JOSHUA LEDERBERG AND ESTHER M. LEDERBERG
Department of Genetics, College of Agriculture, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin

Received for publication August 31, 1951

Elective enrichment is an indispensable technique in bacterial physiology and genetics (van Niel, 1949). Specific biotypes are most readily isolated by the establishment of cultural conditions that favor their growth or survival. It has been repeatedly questioned, however, whether a selective environment may not only select but also direct adaptive heritable changes. In accord with similar discussions in evolutionary biology (Huxley, 1942), we may denote the concepts of spontaneous mutation and natural selection in contrast to specific induction as "preadaptation" and "directed mutation", respectively. Many lines of evidence have been adduced in support of preadaptation in a variety of systems (Luria and Delbrück, 1943; Lea and Coulson, 1949; Burnet, 1929; Newcombe, 1949; Lewis, 1934; Kristensen, 1944; Novick and Szilard, 1950; Ryan and Schneider, 1949; Demerec, 1948; Welsch, 1950; also reviewed: Braun, 1947; Luria, 1947; Lederberg, 1948, 1949). This paper concerns an approach to this problem that makes use of a replica plating technique which facilitates the handling of large numbers of bacterial clones for classification on a variety of media.

METHODS

Replica plating. A frequent chore in bacteriological work is the transfer of isolates from one substrate to other selective or indicator agar media. In place of an inoculating needle, one might imagine a device consisting of many needle tips in fixed array, so that one operation would substitute for repeated transfers with a single needle. The requirements of this design are met by pile fabrics such as velvet or velveteen. The pile provides space in a vertical plane for moisture that might otherwise cause lateral smearing of any impression. (According to Dr. N. Visconti, in a private communication, dampened filter paper may be applicable to some replication problems considered by him independently of the present work.)

In our practice, twelve cm squares were cut from velveteen yardage, packed in large petri dishes, and sterilized in the autoclave. A square is placed, nap up, on a cylindrical wood or cork support of nine cm diameter and held firmly in place with a metal flange or hoop pushed over the fabric and around the rim of the support. The agar plate carrying the initial colonies is inverted onto the

¹ No. 473. This work has been supported by grants from the Research Committee, Graduate School, University of Wisconsin, with funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation, and from the Division of Research Grants and Fellowships, National Microbiological Institute, National Institutes of Health, U. S. Public Health Service.

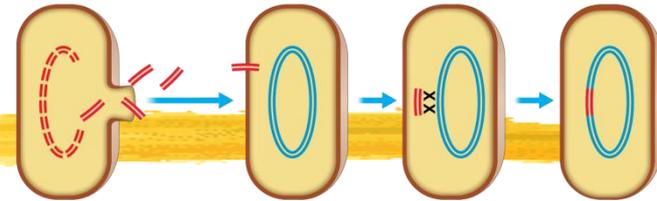
2) mutazioni spontanee

The issue was settled in favor of mutation by demonstrations that resistance could emerge in the absence of an antibiotic and by the transfer of resistance with DNA. For example, the **Lederbergs** showed by replica plating **that streptomycin-resistant colonies of *Escherichia coli* were present in a culture never exposed to the drug**

Introduzione

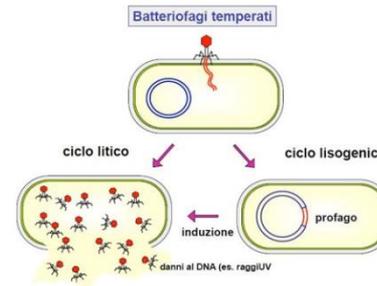
a) TRASFORMAZIONE

Assunzione da parte della **cellula batterica** di **DNA libero** nell'ambiente proveniente **dalla lisi** di un **altro batterio**



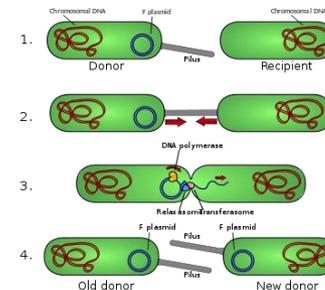
b) TRANSDUZIONE

Meccanismo di trasferimento genetico da un batterio all'altro **mediante un batteriofago** temperato (ovvero in grado di lisogenizzare le cellule infette)



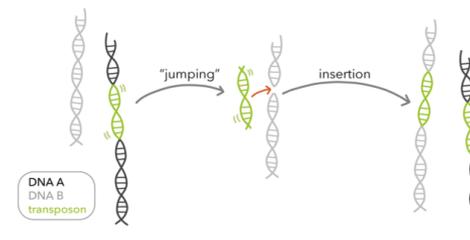
c) CONIUGAZIONE

Passaggio di frammento di DNA da una cellula batterica all'altra **mediante contatto fisico**



d) TRANSPOSIZIONE

Tramite i **transposoni** cioè unità genetiche molto **semplici** veicolanti **resistenze multiple**



Introduzione

MECCANISMI DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

1) Inattivazione dell'antibiotico

2) Diminuita penetrazione dell'antibiotico nel batterio

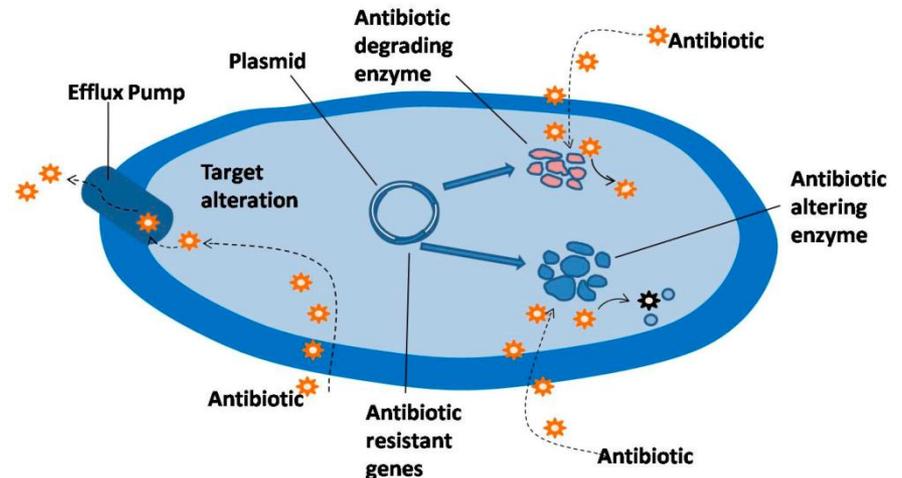
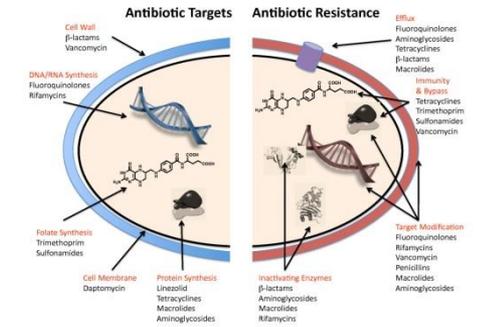
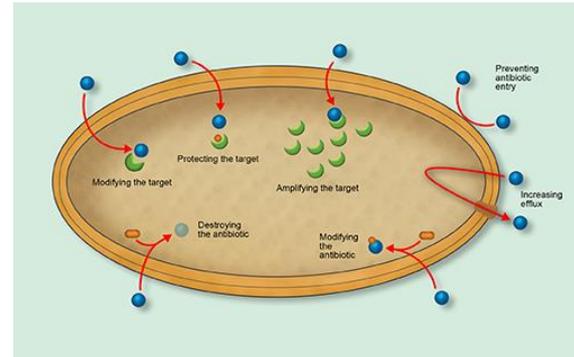
3) Mutazione o modificazione delle strutture bersaglio

4) Aumentata produzione di enzimi inibiti dall'antibiotico

5) Superamento del blocco metabolico con iperproduzione del prodotto carente

6) Iperproduzione di enzimi inattivanti che si legano all'antibiotico

7) Rapido efflusso dell'antibiotico dal batterio



Introduzione

▶ **MECCANISMI DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA**

▶ **ALTRI MECCANISMI (non comunemente in causa nei confronti degli antibiotici comunemente utilizzati)**

- **Aumentata produzione di un metabolita che antagonizza il farmaco**
- **Diminuita richiesta del prodotto della reazione metabolica bloccata dal farmaco**
- **Comparsa di vie metaboliche alternative**

Introduzione

<i>Antibiotic class</i>	<i>Example(s)</i>	<i>Target</i>	<i>Mode(s) of resistance</i>
<i>β-Lactams</i>	<i>Penicillins (ampicillin), cephalosporins (cephamycin), penems (meropenem), monobactams (aztreonam)</i>	<i>Peptidoglycan biosynthesis</i>	<i>Hydrolysis, efflux, altered target</i>
<i>Aminoglycosides</i>	<i>Gentamicin, streptomycin, spectinomycin</i>	<i>Translation</i>	<i>Phosphorylation, acetylation, nucleotidylation, efflux, altered target</i>
<i>Glycopeptides</i>	<i>Vancomycin, teicoplanin</i>	<i>Peptidoglycan biosynthesis</i>	<i>Reprogramming peptidoglycan biosynthesis</i>
<i>Tetracyclines</i>	<i>Minocycline, tigecycline</i>	<i>Translation</i>	<i>Monooxygenation, efflux, altered target</i>
<i>Macrolides</i>	<i>Erythromycin, azithromycin</i>	<i>Translation</i>	<i>Hydrolysis, glycosylat., phosphorylat., efflux, altered target</i>
<i>Lincosamides</i>	<i>Clindamycin</i>	<i>Translation</i>	<i>Nucleotidylation, efflux, altered target</i>
<i>Streptogramins</i>	<i>Synercid</i>	<i>Translation</i>	<i>C-O lyase (type B streptogramins), acetylation (type A streptogramins), efflux, altered target</i>
<i>Oxazolidinones</i>	<i>Linezolid</i>	<i>Translation</i>	<i>Efflux, altered target</i>
<i>Phenicols</i>	<i>Chloramphenicol</i>	<i>Translation</i>	<i>Acetylation, efflux, altered target</i>
<i>Quinolones</i>	<i>Ciprofloxacin</i>	<i>DNA replication</i>	<i>Acetylation, efflux, altered target</i>
<i>Pyrimidines</i>	<i>Trimethoprim</i>	<i>C₁ metabolism</i>	<i>Efflux, altered target</i>
<i>Sulfonamides</i>	<i>Sulfamethoxazole</i>	<i>C₁ metabolism</i>	<i>Efflux, altered target</i>
<i>Rifamycins</i>	<i>Rifampin</i>	<i>Transcription</i>	<i>ADP-ribosylation, efflux, altered target</i>
<i>Lipopeptides</i>	<i>Daptomycin</i>	<i>Cell membrane</i>	<i>Altered target</i>
<i>Cationic peptides</i>	<i>Colistin</i>	<i>Cell membrane</i>	<i>Altered target, efflux</i>

Introduzione

CLASS	TARGET	FUNCTION INHIBITED
Lactams PBPs	Peptidoglycan	synthesis
Glycopeptides	D-Ala-D-Ala of lipid II	Peptidoglycan synthesis
Macrolides	rRNA of 50S ribosome subunit	Protein synthesis
Lincosamides	rRNA of 50S ribosome subunit	Protein synthesis
Chloramphenicol	rRNA of 50S ribosome subunit	Protein synthesis
Oxazolidinones	rRNA of 50S ribosome subunit	Protein synthesis
Tetracyclines	rRNA of 30S ribosome subunit	Protein synthesis
Aminoglycosides	rRNA of 30S ribosome subunit	Protein synthesis/mistranslation
Fluoroquinolones	Topoisomerases (DNA gyrase, topoisomerase IV)	DNA replication
Daptomycin	Membranes	
Metronidazole	DNA	

a Streptomycin, an aminoglycoside, is an exception in that it targets a ribosomal protein, and single-step resistance can occur by mutation in its gene, rpsL.

Lynn L. Silver
Challenges of Antibacterial Discovery
Clin Microbiol Rev, 2011; 24: 71–109

Introduzione

Timeline of Antibiotic Development and Resistance^{2,3}

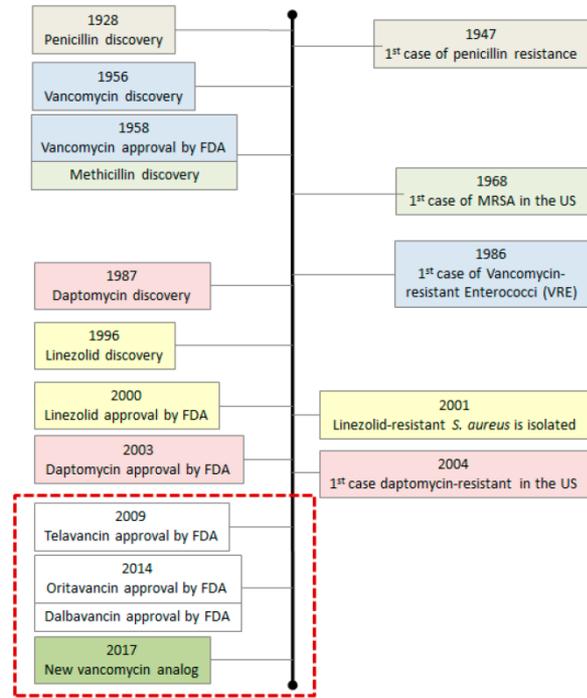
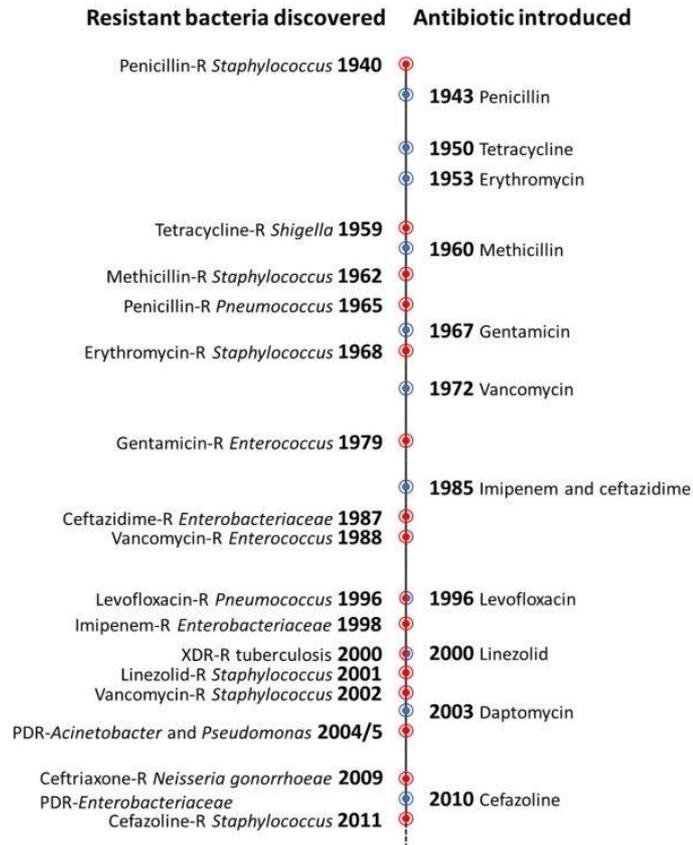


Figure 1^{2,3}

R=resistant; PDR=Pan drug-resistant; EDR=extensively drug resistant

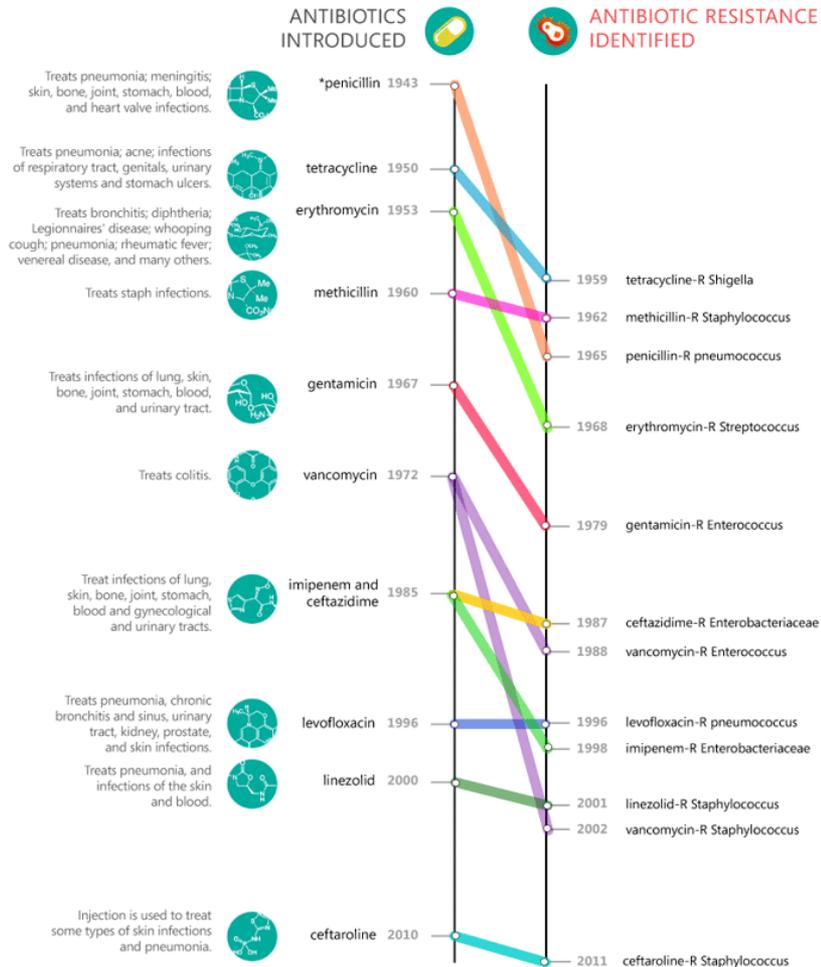
Dates are based upon early reports of resistance in the literature. In the case of PDR *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, the date is based upon reports of health care transmission or outbreaks.

*Penicillin was in limited use prior to widespread usage in 1943.

Introduzione

Timeline of Antibiotic Resistance

Nearly as quickly as life-saving antibiotics are created, new drug-resistant infections appear



*Penicillin-resistant Staphylococcus appeared in 1940, three years before widespread use of the drug.

Source: Centers for Disease Control and Prevention.

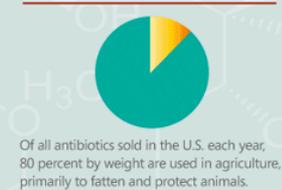
Credits: SwitchYard Media and Food & Environment Reporting Network

YEARLY ANTIBIOTIC-RESISTANT INFECTIONS



More than 2 million people in the U.S. are sickened every year with antibiotic-resistant infections. At least 23,000 die as a result.

ANTIBIOTICS IN AGRICULTURE

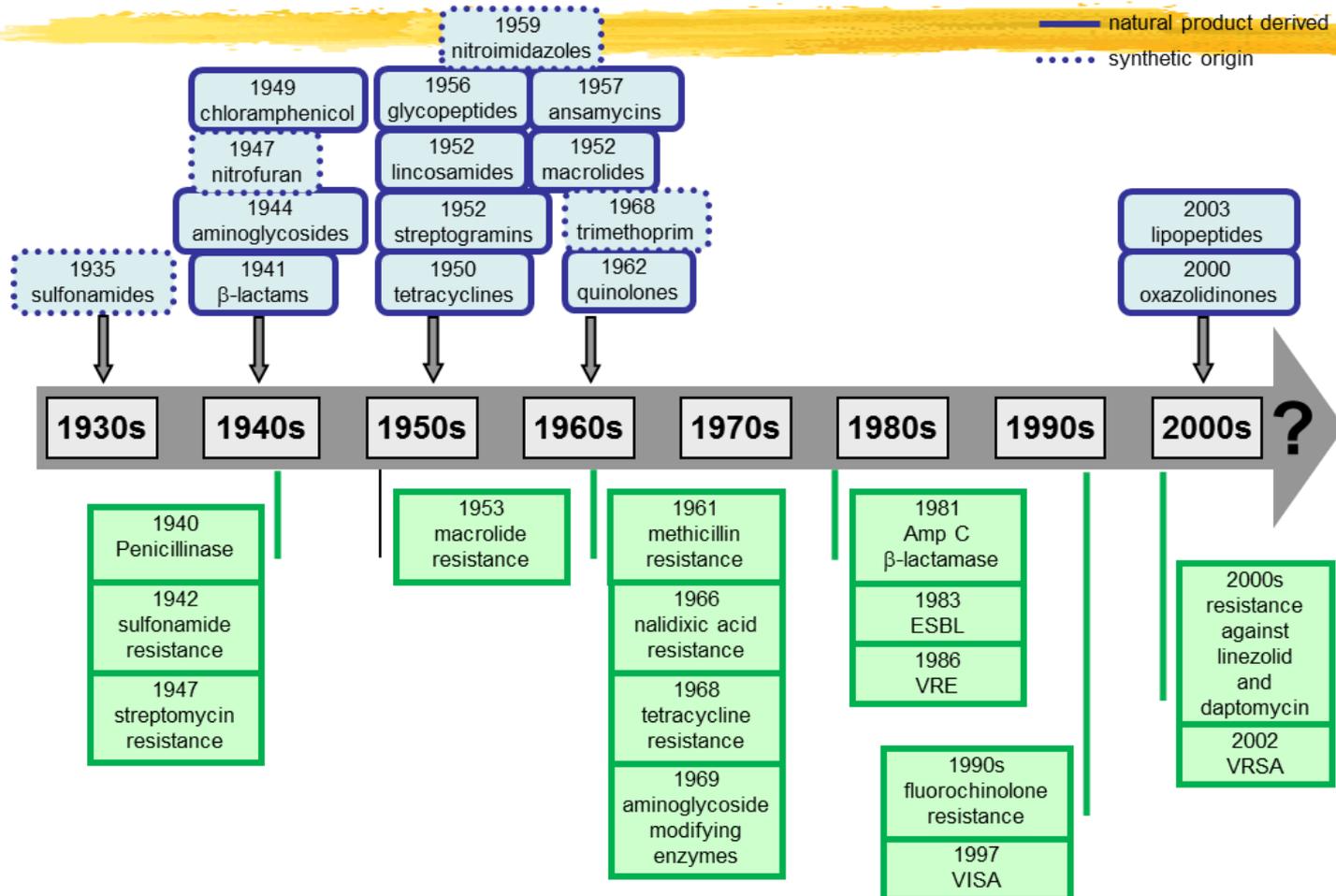


BEFORE ANTIBIOTICS:

- 
- **5 women died** out of every 1,000 who gave birth.
 - **Three out of 10** who contracted pneumonia died.
 - **One out of every 10** people who got a skin infection from a scrape, a cut, or scratching a bite lost a limb

Introduzione

Introduction of new antibiotic classes



Development of bacterial resistance

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Esperimenti di Vincenzo Tiberio

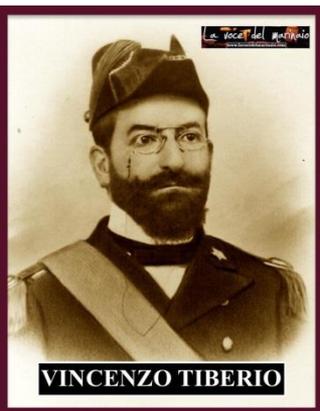


► **Vincenzo Tiberio**, molisano di Sepino, si iscrisse alla facoltà di Medicina dell'Università di Napoli dove frequentò l'istituto di Igiene ancor prima di laurearsi; egli viveva dagli **zii ad Arzano** e proprio in questo paese, osservando, che **l'acqua di pozzo**, ogni qualvolta il pozzo veniva ripulito dalle muffe, **determinava enteriti** fra chi ne faceva uso, cominciò le sue ricerche **sulle muffe**.

► Il lavoro fu pubblicato nel gennaio del **1895**, dalla rivista "**Annali d'Igiene sperimentale**", con il titolo "**Sugli estratti di alcune muffe**". In questo lavoro egli individuò per la prima volta il **potere battericida** di alcune particolari muffe, scrivendo:

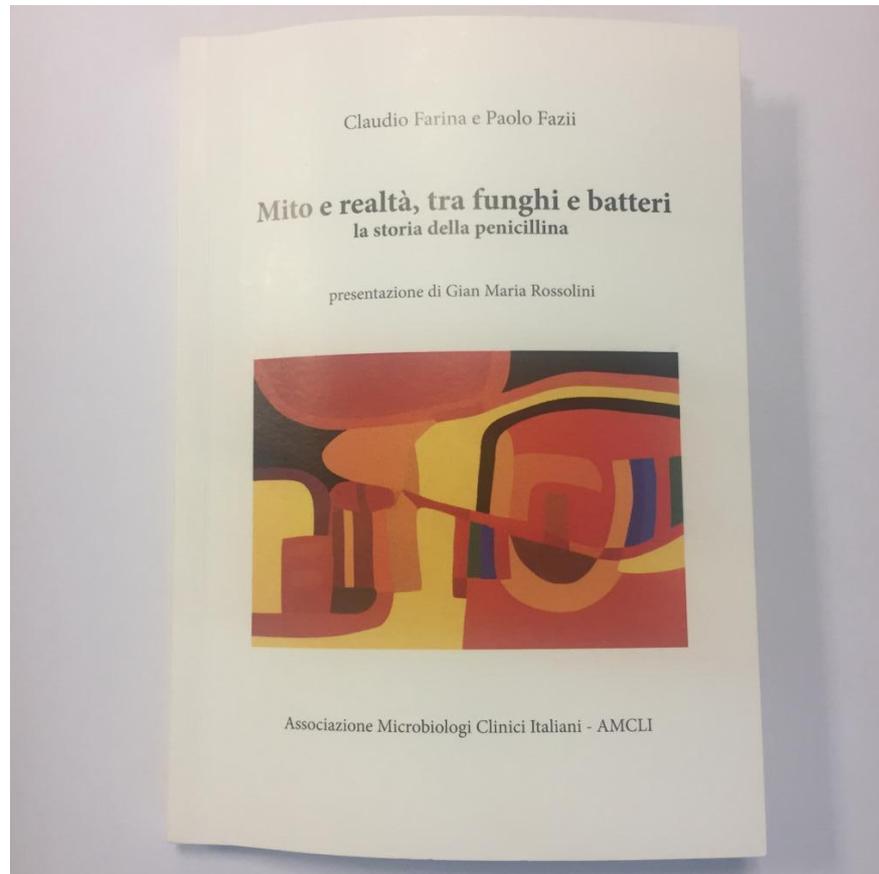
"L'autore ha osservata l'azione degli estratti acquosi del mucor mucedo, del Penicillium glaucum e dello Aspergillus flavescens su alcuni schizomiceti patogeni e su alcuni saprofiti trovandoli forniti, specie quello dell'aspergillo, di notevole potere battericida. Gli estratti acquosi sono risultati forniti di mediocre potere leucocitico, specialmente l'estratto di aspergillo. Nelle infezioni sperimentali con bacillo dell'ileotifo e vibrione del colera, solo quest'ultimo ha dato a dimostrare una certa azione immunizzante e curativa. L'autore ascrive tale azione in parte al potere microbicida dei principi contenuti nelle muffe, ed in parte al potere della leucocitosi da questi prodotta"

► Nel **1895**, dopo la pubblicazione dello studio, lasciò l'Istituto di igiene per contrasti con il nuovo direttore di cattedra e si **arruolò in Marina**. Il fascioletto della sua **ricerca rimase relegato** in uno scaffale polveroso dell'Istituto di igiene **fino al 1955**, quando un «topo di biblioteca» lo riscoprì e **fu ristampato** a cura dell'Istituto di Igiene stesso. I nipoti ne hanno difeso il nome e la memoria, scrivendo anche un libro.



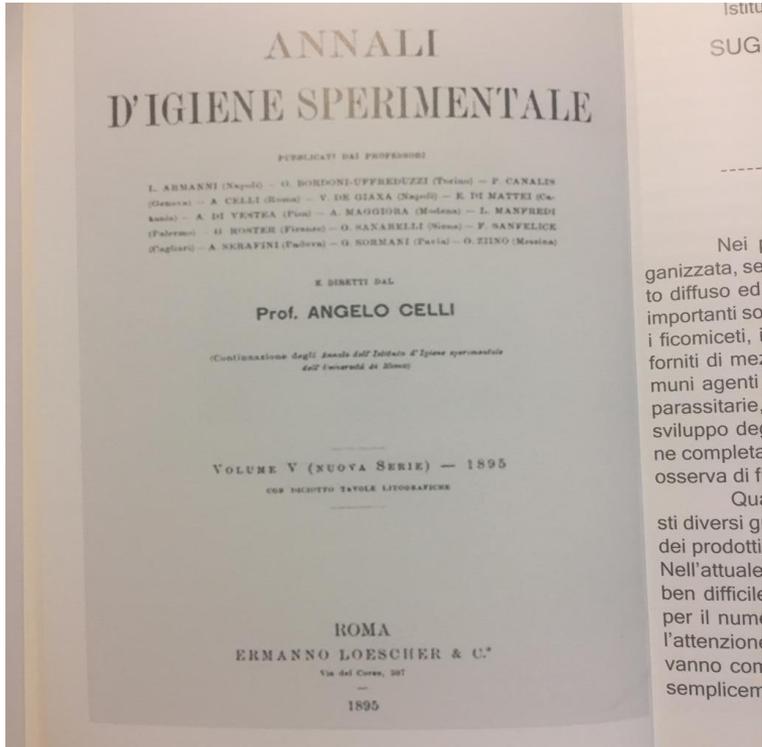
Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Esperimenti di Vincenzo Tiberio



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Esperimenti di Vincenzo Tiberio



Istitu
SUG

Nei
ganizzata, se
to diffuso ed
importanti so
i ficomiceti, i
forniti di me
muni agenti
parassitarie,
sviluppo de
ne complete
osserva di f
Qu
sti diversi g
dei prodotti
Nell'attuale
ben difficile
per il num
l'attenzione
vanno con
semplimen

non è di
o nella
ate per
di ASD,
sciano.

Tabella I.
Iniezione contemporanea nella cavità peritoneale di liquore di muffa (1/2, 4-1 peso della cavia) o di cultura in brodo di

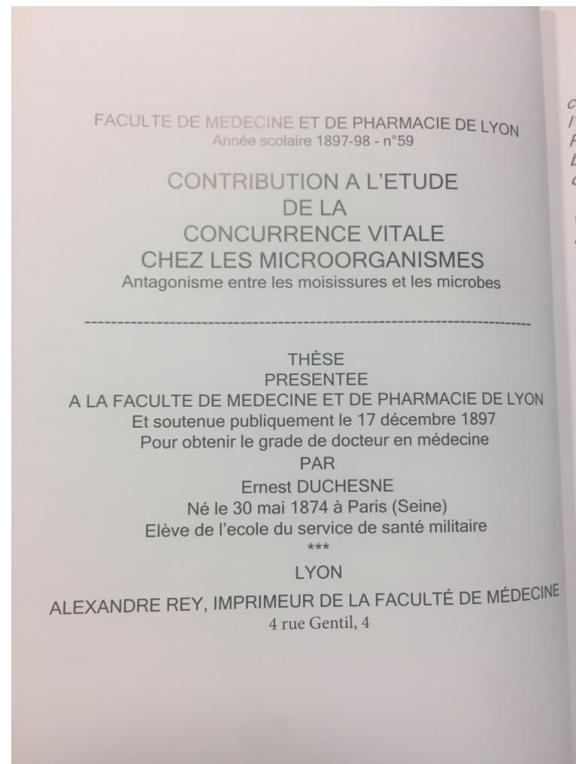
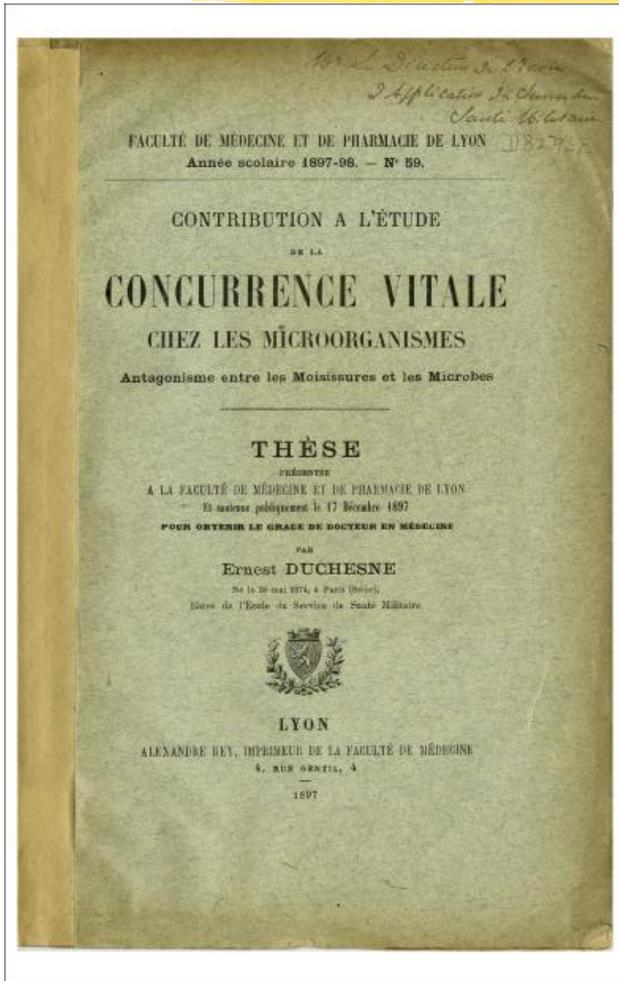
	B. del tipo			V. del cocher			ESITO
	Peso della cavia gr.	Liquore di muffa mg.	Cultura mg.	Peso della cavia gr.	Liquore di muffa mg.	Cultura mg.	
Muc. mucoso	370	2.7	1	360	3.0	0.0	Morte tra 12-18 ore
	400	4.0	1.0	366	3.0	0.0	
	300	3.0	1.2	250	2.5	0.5	
	350	3.5	1.4	230	2.3	0.55	
Pensill. glomerul.	290	2.9	1.16	320	3.2	0.61	Morte dopo 7-18 ore
	245	2.5	0.98	300	3.0	0.5	
	300	3.0	1.2	200	2.0	0.4	
	330	2.9	1.2	330	3.0	0.3	
Aspergillus flavus	420	4.2	2.1	195	2.0	0.4	Dopo 8 giorni stanno bene o son poste fuori osserv.
	440	4.8	1.9	400	4.0	0.3	
	320	3.2	1.1	230	2.5	0.5	
Candida	230	2.0	0.8	230	3.5	0.0	Morte tra 8-15 ore
	330	—	1.3	200	—	0.4	
	329	—	1.3	230	—	0.55	
	470	—	2.4	350	—	0.7	

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



Esperimenti di Ernest Duchesne

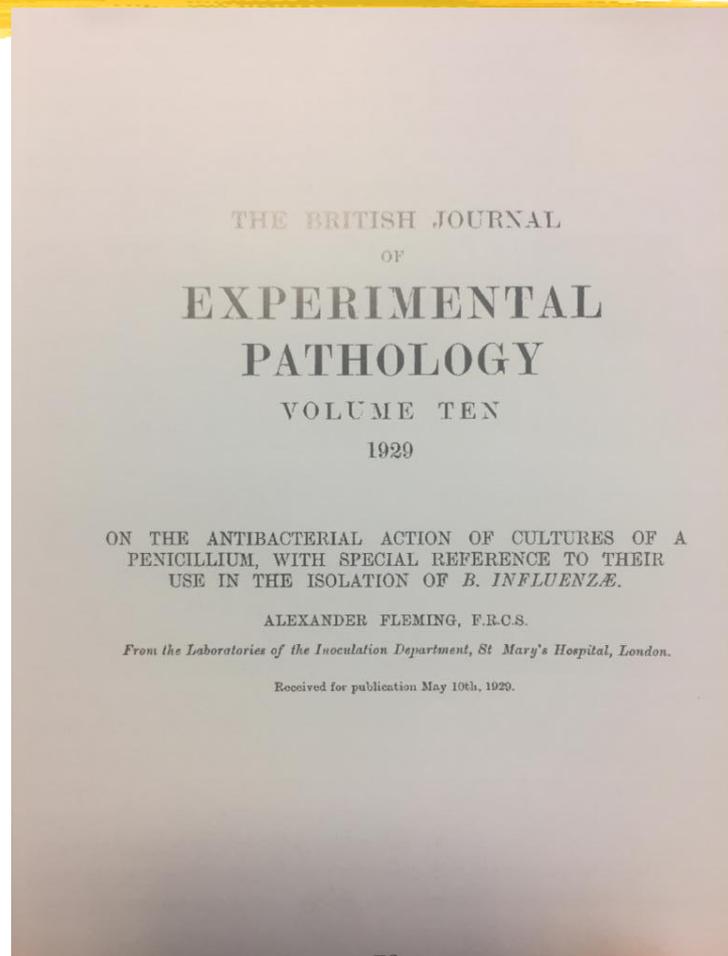


Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



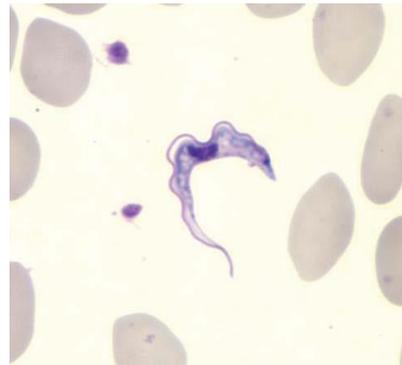
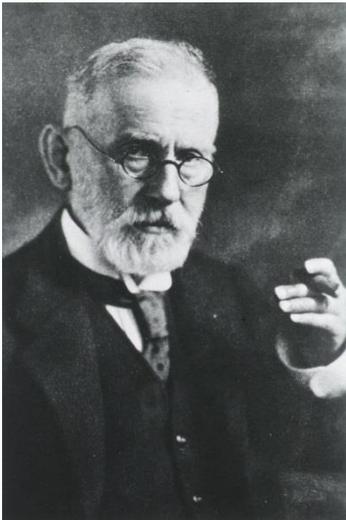
Esperimenti di Alexander Fleming



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Esperimenti di Paul Ehrlich

► La **resistenza** agli **agenti antimicrobici** era già stata riconosciuta **prima** dell'era **antibiotica** **Paul Ehrlich**, il padre della moderna chemioterapia, osservò che, durante il **trattamento** dell'infezione da tripanosomi (*T. brucei*) gli organismi, talora, **erano resistenti** agli agenti usati contro questi protozoi. Ehrlich dimostrò che una **volta acquisita**, questa resistenza era **stabilmente ereditata**; egli, nel **1908** propose che la resistenza quale **ridotta capacità** ("reduced avidity of the chemoreceptors so that they are no longer able to take up") **di captare il farmaco**



2. P. Ehrlich: Über den jetzigen Stand der Chemotherapie.

[Vortrag, gehalten vor der Deutschen Chemischen Gesellschaft
am 31. Oktober 1908.]

Hochverehrte Herren!

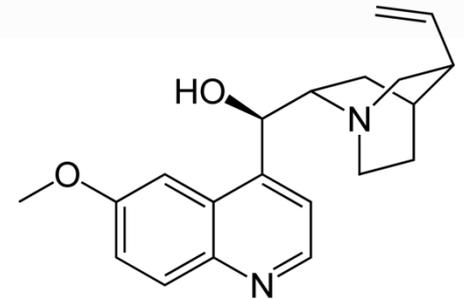
Zunächst möchte ich dem Vorstand der Deutschen Chemischen Gesellschaft und ganz besonders ihrem verehrten Vorsitzenden, Hrn.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Esperimenti di S. Neuschlosz

► **L'inattivazione dei farmaci** fu scoperta anche presto. Nel **1919 Neuschlosz** reportò che il *Paramecium caudatum* **resistente al chinino** ed a certi coloranti **acquisiva l'abilità di distruggere** questi agenti tossici.

Neuschlosz, S. (1919). *Untersuchungen über die gewöhnung an gifte*. *Pflüger's Archiv für Physiologie* 176, 223–235



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Sulfonamidi

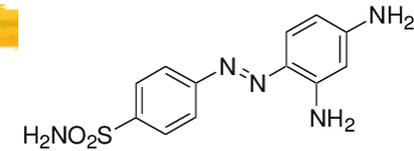
► Nel 1932 Joseph Klarer, coadiuvato da Fritz Mietzsch, sintetizzò un colorante rosso (**Prontosil Rosso =sulfocrisoidina, un sulfonamide**); esso fu trovato **inattivo** come **antibatterico in vitro**

► Nel 1935 Gerhard Dogmagk, continuando gli studi di Erlich sulle infezioni streptococciche murine, dimostrò che il Prontosil era **fortemente attivo in vivo** contro le infezioni da streptococco emolitico e da altri germi. Esso esercita un'attività antibatterica **grazie alla liberazione in vivo** del para-amino benzensulfonamide (**sulfalinamide**);

► **Dogmagk** ricevette il premio **Nobel** per la medicina nel **1939** mentre il reale scopritore, **Joseph Klarer** non fu premiato da alcuno

► Ma già alla **fine degli anni '30** furono isolati degli ***S.pneumoniae* resistenti al Prontosil** (RW, Roos- The Lancet, 1939

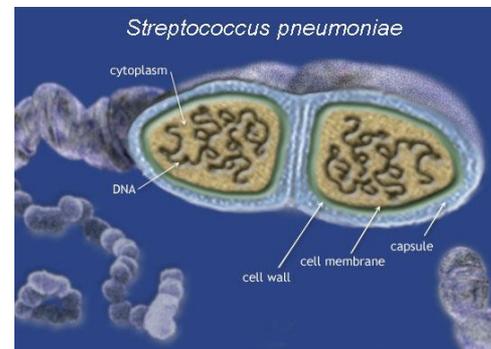
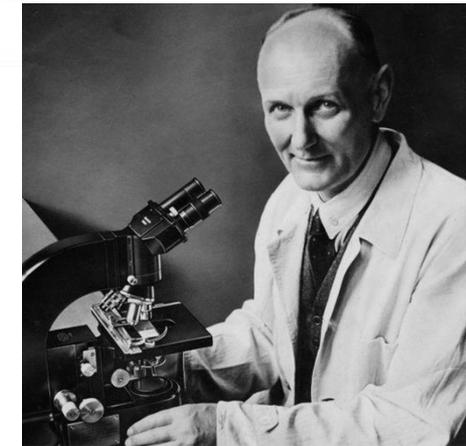
R.W. Ross. ACQUIRED TOLERANCE OF PNEUMOCOCCUS TO M. & B. The Lancet, 1939; 233: 6039



2, Prontosil



C-91



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



Penicillina



The Nobel Prize
Physiology/Medicine 1945



Sir Alexander Fleming
1881 - 1955

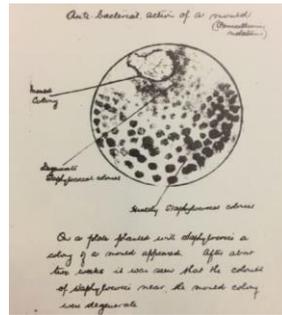


Sir Howard Walter Florey
1898 - 1968



Ernst Boris Chain
1906 - 1979

Alexander Fleming discovered the antimicrobial properties of penicillin in 1928. ... years later, Howard Florey and Ernst Chain developed the processes to produce penicillin



- L'attività **scientifica di Tiberio**, che **completò l'intero ciclo sperimentale** dall'osservazione, alla verifica dell'ipotesi iniziale, **fino alla preparazione** delle sostanza antibiotica, dimostra **come Tiberio** fosse già **molto più avanti** di quanto **non lo fosse Alexander Fleming nel 1930**. Quest'ultimo, come egli stesso riferì, arrivò peraltro alla **scoperta della Penicillina a causa di un errore procedurale**, “la **contaminazione involontaria (?) di una capsula** contenente colonie di *Staphylococcus aureus* con colonie **fungine**”, che aveva poi prodotto “**un'inibizione della crescita** batterica nelle colonie di *Staphylococcus aureus*”. Tuttavia, Fleming **non riuscì** poi a preparare sperimentalmente **il farmaco**, non chiudendo così il ciclo di ricerca, come aveva invece fatto Tiberio
- E Fleming? Il grande microbiologo scozzese riconobbe mai i meriti di Tiberio? **Chain**, uno dei tre premi Nobel assieme a Fleming, affermò, in un'intervista che, **il suo illustre collega conosceva Tiberio e i suoi lavori**. Lui però **non lo disse mai apertamente**.



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Penicillina

► Il tasso di mortalità per batteriemia da *Staphylococcus aureus* nel **Boston City Hospital** che era del **82% nel 1941**, fu drasticamente ridotto con l'introduzione delle penicillina nei primi anni '40

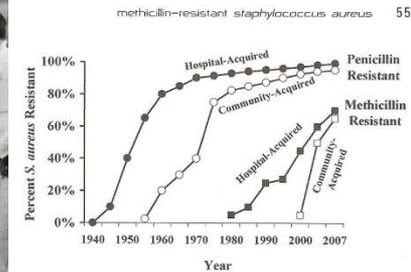


► Tuttavia già nel **1943**, prima dell'introduzione dell'antibiotico, comparvero alcuni **ceppi di *S.aureus*** che avevano sviluppato **resistenza alla penicillina** e che si **svilupparono rapidamente**

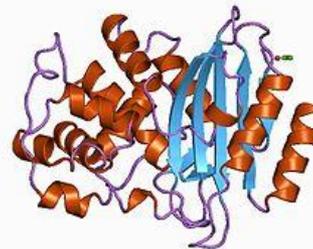


► La **resistenza** era causata dalla **penicillinasi**, una **beta lattamasi**

■ Abraham, E. P., and E. Chain. 1940. *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*. Rev. Infect. Dis. 10:677-678



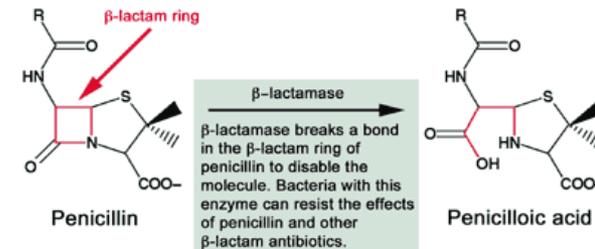
► L'identificazione della penicillinasi prima dell'uso dell'antibiotico **oggi sono facilmente spiegati dal fatto che un numero di R geni (geni di Resistenza) sono componenti della popolazione microbica naturale ambientale ed animale**



► *“Which came first, the antibiotic or resistance?”*

■ D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes, and G. D. Wright. 2006. *Sampling the antibiotic resistome*. Science 311:374-377

Penicillin Resistance

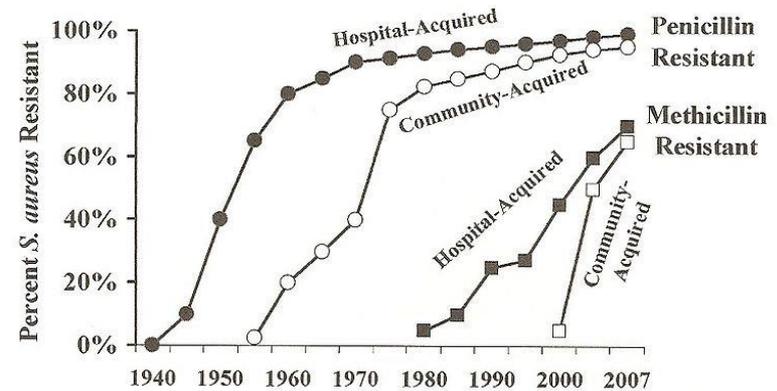


Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Penicillina

methicillin-resistant *staphylococcus aureus* 55

- ▶ **6 anni** per raggiungere il **25%** di resistenza fra i ceppi **nosocomiali**, **15-20 anni** per raggiungere il **25%** dei ceppi **comunitari**
- ▶ Beta **lattamasi** = **enzima** prodotto dai batteri che **inattiva** il legame fra il **PBP** e **penicillina**
- ▶ La resistenza in *Staphylococcus aureus* si realizzò nel **1953** nel ceppo *S. aureus* phage-type **80/81** pandemico, che ha rappresentato il **primo superbug mondiale** sino alla scoperta della **resistenza alla Meticillina**



Ambler Classification of β -lactamases

Ambler Class	A	B	C	D
Active Site	Serine	Metallo (zinc-binding thiol)	Serine	Serine
Enzyme Type	TEM, SHV, CTX-M, KPC	NMD-1, IMP, VIM	AmpC, CMY	OXA
Host Organisms	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	Enterobacteriaceae and Non-fermenters
Substrates	Ampicillin; cephalotin; penicillins; 3 rd gen cephalosporins; Extended spectrum cephalosporins; carbapenems	All β -lactams	Cephameycins; 3 rd generation cephalosporins	Cloxacillin; Extended-spectrum cephalosporins; carbapenems

KPC-2 is the most prevalent class A carbapenemase in the world and can hydrolyze the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam.



- ▶ **Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7:629–641.**

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Penicillina

- ▶ L'inaspettata identificazione di resistenza agli antibiotici mediante materiale geneticamente trasferibile, si realizzò in Giappone, negli anni '50 e fu valutata, inizialmente, con molto scetticismo in Occidente.
- ▶ In Giappone nel 1952 si evidenziò l'emergenza di ceppi MDR di *Shigella spp* (tetraciline, streptomina e sulfamidici) che seguiva, apparentemente, il trasferimento orizzontale di geni di resistenza trasferiti mediante campioni fecali dai ceppi di *E.coli*. Tale trasferimento genetico si realizzò in ambito nosocomiale sotto trattamento antibiotico (osservazioni del 1959)
- ▶ Alla fine degli anni '50 in Giappone vi furono numerosi studi sul trasferimento di antibiotico-Resistenza tramite i plasmidi. La dimostrazione di resistenze trasferibili è datata solo 1959 ma, prende spunto da altre precedenti osservazioni. Importante fu il lavoro di sintesi effettuato (in Inglese) da Watanabe eseguito sul fattore R in Giappone. Sempre in Giappone, successivamente furono isolati isolati ceppi di *Shigella* multi-resistenti fino a 5 antibiotici.

KITAMOTO, O. et al. 1956 *Drug sensitivity of the Shigella strains isolated*. In Meeting of the Kanto Branch of the Society of Japanese Bacteriologists.

NAKAYA, R. et al. 1960b *Resistance transfer agents in Shigella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 654-659.

WATANABE, T., 1963 *Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria*. Bacteriol. Rev. 27: 87-115.

WATANABE, T., and T. FUKUSAWA, 1960a *Episomic resistance factors in Enterobacteriaceae. 1. Transfer of resistance factors by conjugation among Enterobacteriaceae*. Med. Biol. 56: 56-59.

WATANABE, T., and T. FUKUSAWA, 1960b *"Resistance transfer factor" an episome in Enterobacteriaceae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 87-115.



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Penicillina

Hedges, R. W. & Jacob, A. E. (1974).
*Transposition of ampicillin resistance from
RP4 to other replicons.* Mol. Gen. Genet.
132, 31–40

Stokes, H. W. & Hall, R. M. (1989). *A novel
family of potentially mobile DNA elements
encoding site-specific gene-integration
functions: integrons.* Mol. Microbiol. 3, 1669–
1683 XXX

Hughes VM, Datta N. *Conjugative plasmids in
bacteria of the 'pre-antibiotic' era.* Nature
1983;302:725-6

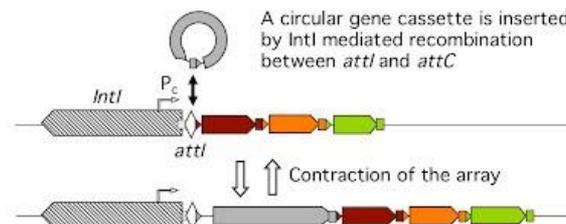
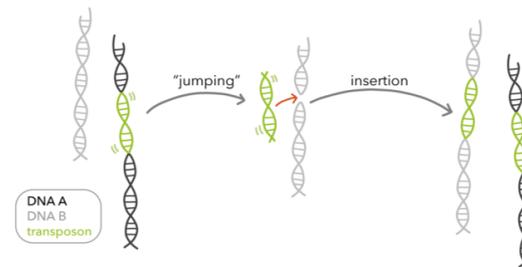
► Successivamente furono fatte altre scoperte di R-plasmidi e furono trovati in tutto il mondo non solo in *Enterobacteriaceae* ma anche in *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, stafilococchi, enterococchi, *Bacteroides*, clostridi, e, virtualmente, in ogni altra specie esaminata.

► Hughes e Datta hanno descritto anche dei plasmidi in epoca pre-antibiotica, che non trasmettevano geni con attività antibiotica

► Scoperta dei transposoni da parte di Hedges e degli integroni da parte Stokes

► Classificazione degli R plasmidi (Meyer)

Meyer, R.J., L. et al. 1985. *Broadhost-range plasmid R1162: replication, incompatibility and copy-number control*, p.173-188. In D.R. Helinski, S.N. Cohen, D.B. Clewell, D.A. Jackson, and A. Hollaender (ed.), *Plasmids in bacteria*, vol.30. Plenum Publishing Corp., New York



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Penicillina

► I geni di R o esistono **già in natura** oppure sono **causati da mutazioni**.
Una rapida mutazione è stata osservata grazie alla comparsa della **TEM β lactamase**, risultante nell'estensione del profilo che include anche le **cefalosporine di III generazione** (prima osservazione in **Atene nel 1963**, un anno dopo l'introduzione dell'**Ampicillina**)

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P.
Penicillinase Synthesis Controlled by Infectious R Factors in Enterobacteriaceae.
Nature 1965 Vol.208 pp.239-41

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 1977, p. 528-533
Copyright © 1977 American Society for Microbiology

Vol. 11, No. 3
Printed in U.S.A.

Plasmid-Mediated Beta-Lactamase Production in *Neisseria gonorrhoeae*

LYNN P. ELWELL,* MARILYN ROBERTS, LEONARD W. MAYER, AND STANLEY FALKOW
Department of Microbiology and Immunology, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington 98195

Received for publication 6 December 1976

Scoperta dei
TEM (*H.influenzae*
e gonococco)

INFECTION AND IMMUNITY, Aug. 1975, p. 404-410
Copyright © 1975 American Society for Microbiology

Vol. 12, No. 2
Printed in U.S.A.

Plasmid-Linked Ampicillin Resistance in *Haemophilus influenzae* Type b

LYNN P. ELWELL,* JOHANNES DE GRAAFF,† DAVID SEIBERT, AND STANLEY FALKOW
Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington 98195

Received for publication 31 March 1975

Ambler Classification of β -lactamases

Ambler Class	A	B	C	D
Active Site	Serine	Metallo (zinc-binding thiol)	Serine	Serine
Enzyme Type	TEM, SHV, CTX-M, KPC	NMD-1, IMP, VIM	AmpC, CMY	OXA
Host Organisms	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.	Enterobacteriaceae and Non-fermenters
Substrates	Ampicillin; cephalotin; penicillin; 2 nd gen cephalosporins; Extended- spectrum cephalosporins; carbapenems	All β -lactams	Cepharmycin; 3 rd -generation cephalosporins	Cloxacillin; Extended-spectrum cephalosporins; carbapenems

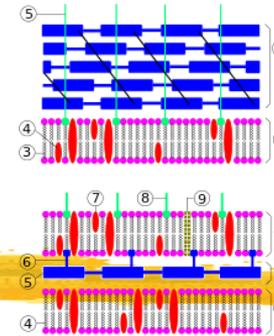
KPC-2 is the most prevalent class A carbapenemase in the world and can hydrolyze the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam.

Storia della resistenza ai farmaci

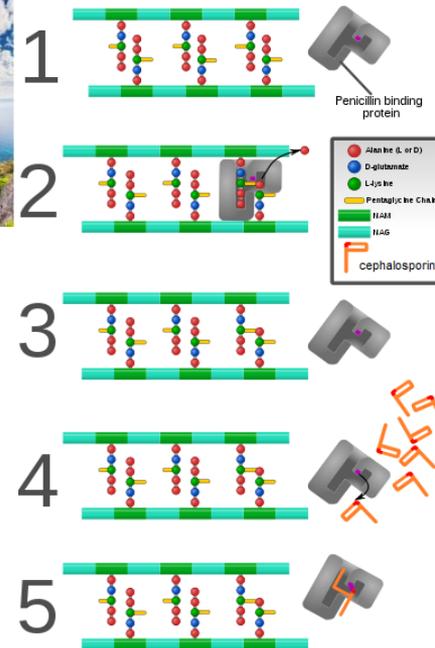
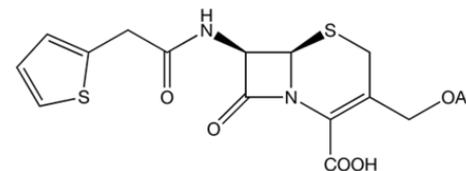
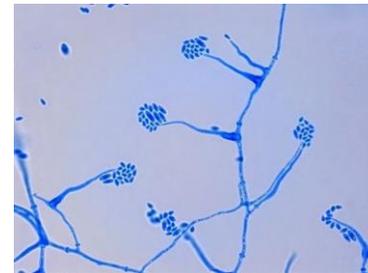
P. Fazii



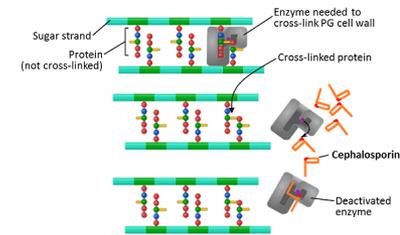
antibatterici Cefalosporine



- ▶ Scoperte da un igienista **sardo nel 1945**.
- ▶ Questi ipotizzò che il processo di **autodepurazione dell'acqua** poteva essere in parte dovuto a **sostanze prodotte** da alcuni microrganismi **inibitori di altri microbi**.
- ▶ Egli cominciò a cercare microrganismi in grado di produrre sostanze antibiotiche.
- ▶ Isolò un fungo il *Cephalosporium acremonium* da **acqua di mare** che si trovava nelle vicinanze dei liquami di scarico a **Kaglara, vicino Cagliari**. Questo fungo **inibiva la crescita** di alcuni batteri sia **Gram + che Gram -**
- ▶ Inviò le **sostanze ottenute dal fungo** (contenute in brodi di coltura) ad Oxford dal **Prof. Edward P. Abraham**.
- ▶ Dai brodi di coltura **Abraham isolò diverse sostanze** antibatteriche fra cui, la più attiva, **la Cefalosporina C**, da cui, derivò la prima cefalosporina di uso clinico.



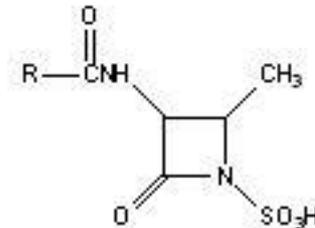
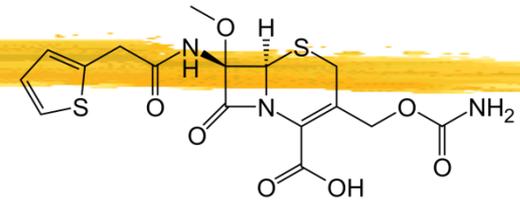
- ▶ Era iniziata **l'era delle cefalosporine** che avevano largo spettro antibatterico, erano resistenti agli acidi ed alle penicillinasi. **La prima cefalosporina il Cefalotin** fu brevettata da Eli **Lilly nel 1964**.
- ▶ Le cefalosporine agiscono **inibendo la sintesi della parete cellulare batterica**, in particolare **del peptidoglicano**. Il peptidoglicano è un polimero costituito da catene parallele di carboidrati azotati, unite fra loro da legami trasversali
- ▶ Oggi si conoscono **cinque classi di cefalosporine**



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Cefalosporine

- ▶ Nel 1978 fu approvata per uso clinico negli USA un'altra cefalosporina, la **Cefoxitina**
- ▶ Era la prima di una nuova classe di beta-lattamici le **cefamicine**, prodotte non da un fungo, bensì da un batterio filamentoso lo *Streptomyces clavuligerus*
- ▶ La scoperta che batteri arcaici come *Nocardia* e *Streptomyces* producevano antibiotico beta-lattamici rappresenta una **pietra miliare**
- ▶ Alcuni batteri (*Pseudomonas acidophila*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Gluconobacterium* e *Chromobacterium*) erano in grado di produrre **Monobattami**
- ▶ Con l'avvento di Cefoxitina iniziò l'era delle **cefalosporine** (tardi anni '70, primi anni '80)
- ▶ A quel tempo la Cefoxitina era resistente all'idrolisi di tutti le conosciute beta-lattamasi mediate da plasmide
- ▶ Mentre la classe **cromosomiale di C/3 lattamasi** comune in *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* e *Pseudomonas* erano in grado di inattivare la Cefoxitina



CEPHALOSPORIN CLASSIFICATION

- Cephalosporin are antimicrobial drugs, Acts by inhibiting bacterial cell wall synthesis
- Classified into 5 generations

1 st GENERATION	2 nd GENERATION	3 rd GENERATION	4 th GENERATION	5 th GENERATION
<ul style="list-style-type: none"> • CEFAZOLIN • CEFALOTHIN • CEFALORIDINE • CEFADROXIL • CEPHALEXIN • CEPHRADINE 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFOXITIN • CEFPROZIL • CEFOTITAN • CEFMETAZOLE • CEFACLOR • CEFUROXIME 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFEXIME • CEFTAZIDIME • CEFOTAXIME • CEFTIZOXIME • CEFPODOXIME • CEFTRIAZONE • CEFOPERAZONE • CEFTIBUTEN • CEFDINIR • MOXALACTAM 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFEPIME • CEFPIROME 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFTOBIPROLE • CEFTAROLINE

- Drugs that have 'FA' or 'PHA/PHRA' in their name are 1st generation except Cefaclor which is 2nd generation drug
- Drugs that end with 'IME' or 'ONE' or 'TEN' are 3rd generation except Cefuroxime which is 2nd generation drug
- Drugs that have 'PI' in their name are 4th generation
- Drugs that have 'ROL' in their name are 5th generation

Storia della resistenza ai farmaci

antibatterici Cefalosporine

► In effetti già nel 1978 cominciarono le osservazioni di cefalosporina-Resistenza: ceppi di *Klebsiella oxytoca* producevano una beta-lattamasi cromosomiale di Classe A e furono osservati a Ginevra resistenze di questi batteri al Cefuroxime .

► Fra il 1978 ed il 1981 durante un *outbreak* di infezioni da *K.oxytoca* gentamicina-resistente, furono evidenziati ceppi in grado di essere resistenti al Cefuroxime e al Cefotaxime (mediante Beta-lattamasi cromosomiali di Classe A)

► 1982: Mutazione dei geni strutturali con produzione di plasmidi 3 beta-lattamasi TEM, SHV, OXA con aumento della loro affinità per le cefalosporine di III generazione e per i monobattami

► 1983: scoperta di isolati di *Klebsiella* resistenti alle oxyiminocefalosporine in Germania (tre ceppi isolati a Francoforte producevano alterate SHV-1/3 lattamasi denominate come SHV-2 che conferivano resistenza al cefotaxime)

Knothe H et al. *Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection 1983; 11:315 -7.

Labia R et al. *Klebsiella oxytoca beta-lactamases: study of their action on third-generation cephalosporins*. Pathol Biol (Paris) 1986; 34:611-5.

Hart CA, Percival A. *Resistance to cephalosporins among gentamicin-resistant klebsiellae*. J Antimicrob Chemother 1982; 9:275-86.

Fournier B et al. *Klebsiella oxytoca: resistance to aztreonam by overproduction of the chromosomally encoded beta-lactamase*. FEMS Microbiol Lett 1994; 116:31-6.

Fournier B et al. *Point mutation in the Pribnow box, the molecular basis of beta-lactamase overproduction in Klebsiella oxytoca*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1365-8.

Pornull KJ et al. *Production of a plasmid mediated AmpC-like beta-lactamase by a Klebsiella pneumoniae septicaemia isolate*. J Antimicrob Chemother 1994; 34:943-54

CEPHALOSPORIN CLASSIFICATION

- Cephalosporin are antimicrobial drugs, Acts by inhibiting bacterial cell wall synthesis
- Classified into 5 generations

1 st GENERATION	2 nd GENERATION	3 rd GENERATION	4 th GENERATION	5 th GENERATION
<ul style="list-style-type: none"> • CEFAZOLIN • CEFALOTHIN • CEFALORIDINE • CEFADROXIL • CEPHALEXIN • CEPHRADINE 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFOXITIN • CEFPROZIL • CEFOTITAN • CEFMETAZOLE • CEFACLOR • CEFUROXIME 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFEXIME • CEFTAZIDIME • CEFOTAXIME • CEFTIZOXIME • CEFPODOXIME • CEFTRIAXONE • CEFOPERAZONE • CEFTIBUTEN • CEFDINIR • MOXALACTAM 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFEPIME • CEFPIROME 	<ul style="list-style-type: none"> • CEFTOBIPROLE • CEFTAROLINE

- Drugs that have 'FA' or 'PHA/PHRA' in their name are 1st generation except Cefaclor which is 2nd generation drug
- Drugs that end with 'IME' or 'ONE' or 'TEN' are 3rd generation except Cefuroxime which is 2nd generation drug
- Drugs that have 'PI' in their name are 4th generation
- Drugs that have 'ROL' in their name are 5th generation

Ambler Classification of beta-lactamases

Ambler Class	A	B	C	D
Active Site	Serine	Metallo <small>(zinc-binding thiol)</small>	Serine	Serine
Enzyme Type	TEM, SHV, CTX-M, KPC	NMD-1, IMP, VIM	AmpC, CMY	OXA
Host Organisms	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	Enterobacteriaceae and Non-fermenters
Substrates	Ampicillin; cephalosin; penicillins; 3 rd gen cephalosporins; Extended spectrum cephalosporins; carbapenems	All beta-lactams	Cephams; 3 rd -generation cephalosporins	Cloxacillin; Extended-spectrum cephalosporins; carbapenems

KPC-2 is the most prevalent class A carbapenemase in the world and can hydrolyze the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Cefalosporine

▶ Le **principali resistenze** alle cefalosporine sono causate dalle **beta-lattamasi** prodotte dai batteri.

▶ **Tre meccanismi** conosciuti di resistenza:

1) **Modificazione del target PBP**

2) **Inattivazione mediante le lattamasi**

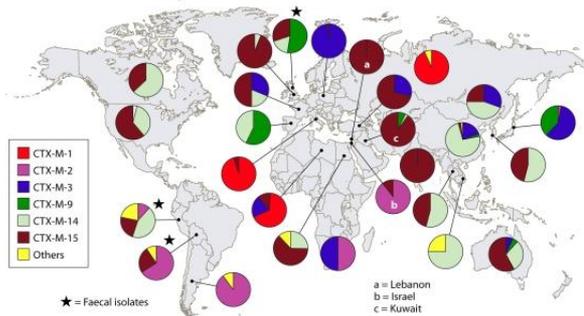
3) **Impossibilità del farmaco a raggiungere il target PBP** nella cellula batterica

Ambler Classification of β -lactamases

Ambler Class	A	B	C	D
Active Site	Serine	Metallo (zinc-binding thiol)	Serine	Serine
Enzyme Type	TEM, SHV, CTX-M, KPC	NMD-1, IMP, VIM	AmpC, CMY	OXA
Host Organisms	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	Enterobacteriaceae and Non-fermenters	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	Enterobacteriaceae and Non-fermenters
Substrates	Ampicillin; cephalotin; penicillins; 3 rd gen cephalosporins; Extended-spectrum cephalosporins; carbapenems	All β -lactams	Cepharmycins; 3 rd -generation cephalosporins	Cloxacillin; Extended-spectrum cephalosporins; carbapenems

KPC-2 is the most prevalent class A carbapenemase in the world and can hydrolyze the β -lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam.

The Trade Routes of the CTX-M Enzymes



Cephalosporins

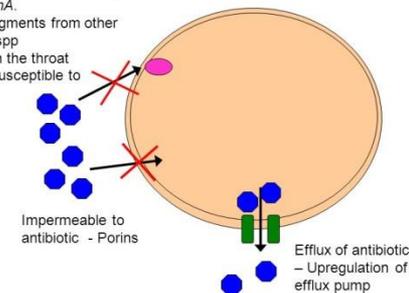
- **Mechanism of action: binds to penicillin binding proteins and inhibition of formation of cell wall**
- Mechanisms of resistance:
 - Changes in drug target of penicillin binding proteins - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
 - Lack of access of the drug to the penicillin binding protein target
 - Efflux pumps – MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*
 - Decreased permeability of cell wall – less common for cephalosporins
 - Alteration of drug itself by hydrolysis by beta-lactamases
 - Numbers and types of beta-lactamases increasing
 - Can be chromosomally or extra-chromosomally (more easily transmitted to other organisms) mediated

Dr.T.V.Rao MD

7

Cephalosporins - mechanisms of resistance

- Modification of target – penicillin binding protein encoded by *penA*.
- Mosaic *penA* gene fragments from other commensal *Neisseria* spp
 - Usually found in the throat
 - Naturally less susceptible to cephalosporins



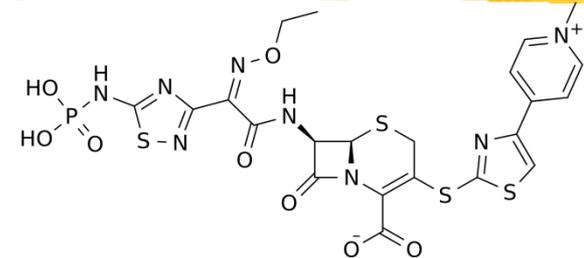
20

Antibiotic resistance in *N. gonorrhoeae*

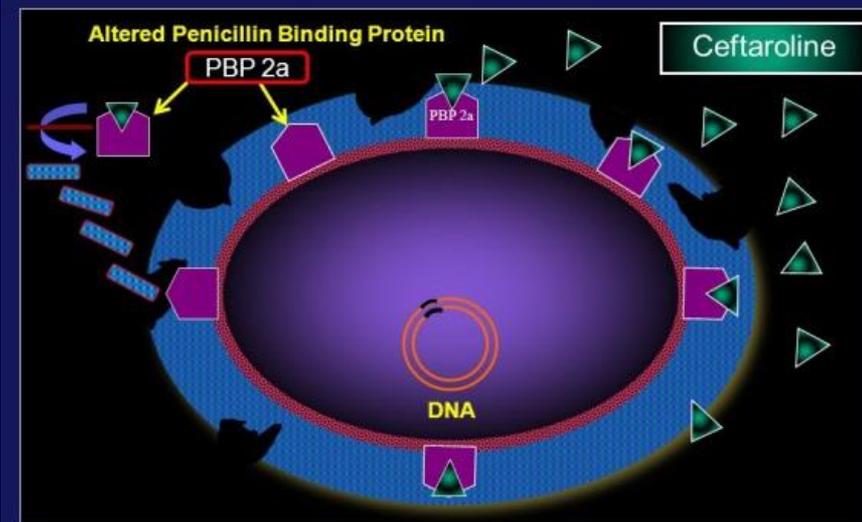
Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Cefalosporine

- ▶ La **Ceftarolina** è una **cefalosporina di V generazione**, prodotta da **Forest Laboratories**, sotto licenza di **Takeda**. E' stata approvata negli **USA, nel 2010**, per il trattamento di **polmoniti batteriche** e di infezioni **cutanee causate da Gram +**.
- ▶ E' **attiva** nei confronti di **MRSA**, pur avendo attività anche nei confronti di **Gram -**
- ▶ **L'azione battericida** è dovuta all'inibizione della sintesi della parete cellulare mediata da legami alle essenziali **PBP**s
- ▶ **Ma già nel 2008** sono stati isolati **ceppi di S.aureus Ceftarolina R**

Rodrigo E. et al. *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus displaying increased MICs of ceftaroline*. J Antimicrob Chemother. 2012;67(6):1321-4



Ceftaroline (*Teflaro*): Mechanism of Action



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



Aminoglicosidi

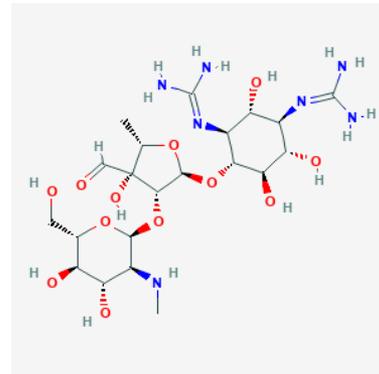
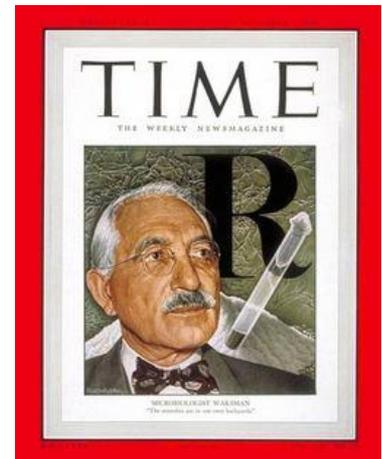
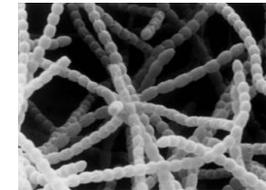
► La **Streptomicina** fu isolata il 19 ottobre 1943 da **Albert Schatz**, uno studente del laboratorio di **Selman Abraham Waksman** alla **Rutgers University** in un progetto di ricerca finalizzato da Merck & Co.

► **Selman Abraham Waksman**, ucraino naturalizzato statunitense, agronomo, che nella ricerca di “**antibiotici**”, termine da lui coniato, **nel letame**, isolò un ceppo di *Streptomyces griseus*, da cui si ottenne la streptomicina .

► La streptomicina è un **inibitore della sintesi proteica**. Si lega **all'rRNA 16S** della **subunità 30S** e **impedendole** di interagire col formil-metionil-tRNA. Questo **porta a errori di lettura**, inibizione della sintesi proteica e infine **morte del batterio** attraverso meccanismi non ancora del tutto chiariti.

► Le **differenze** esistenti fra i **ribosomi umani** e quelli **batterici** permette al farmaco di aggredire **solo i secondi**, risultando poco tossico per l'uomo.

► La streptomicina è efficace contro batteri sia **Gram positivi** che **Gram negativi** ed è quindi un utile antibiotico ad ampio spettro



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

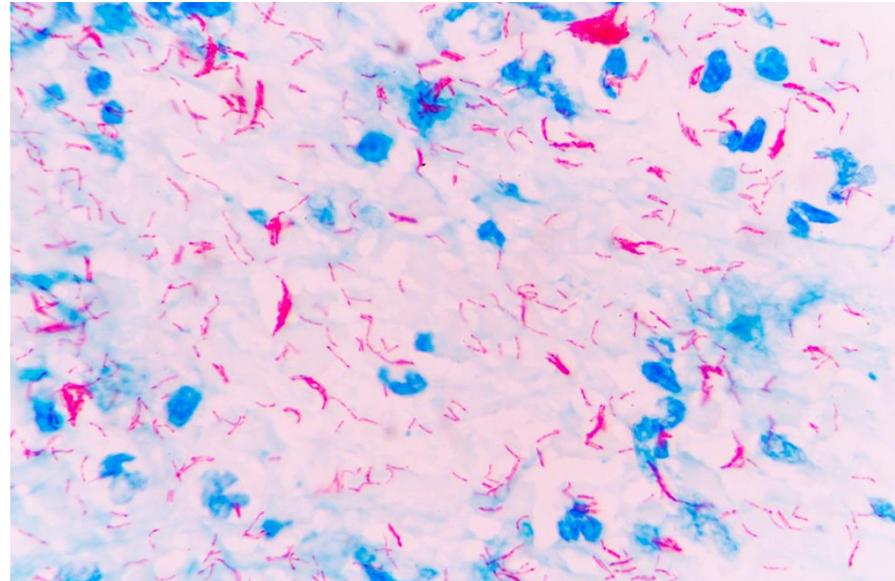
Aminoglicosidi

► Pyle, M. M. 1947. *Relative numbers of resistant tubercle bacilli in sputa of patients before and during treatment with streptomycin*. Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 22:465–473

► Le **basi della resistenza** alla Streptomicina rimase un **puzzle** da risolvere per **molti anni**. Le mutazioni che causavano resistenza alla Streptomicina venivano **osservate in bassa frequenza in molte specie di batteri**, ma, **sfortunatamente** anche in *Mycobacterium tuberculosis* nelle cui infezioni **veniva usato da solo**

► Meccanismi di resistenza:

- Fosforilazione
- Acetilazione
- Nucleotidilazione
- Pompa d'efflusso
- Target alterato



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Tetraciclina

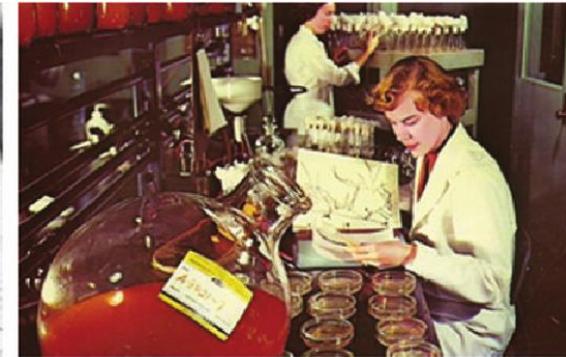
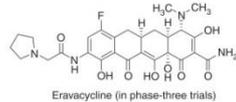
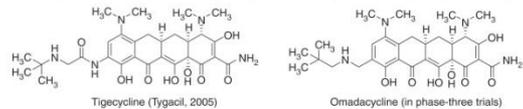
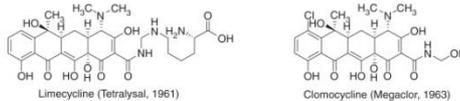
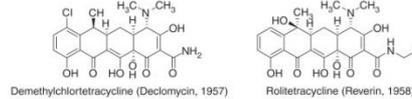
- Le tetraciclina sono **un'ampia famiglia di antibiotici** scoperta **Benjamin Minge Duggar (della Lederle Laboratories)** nel **1945** come **prodotti naturali** e descritti per la **prima volta nel 1948**.
- La prima tetraciclina, la **clortetraciclina (Aureomicina)** fu isolata in colture di ***Streptomyces aureofaciens***.
- È del **1950** la scoperta della **ossitettraciclina (Terramicina)**, isolata dallo ***Streptomyces rimosus***. Successivamente sono state scoperte **numeroso altre molecole** alcune **semisintetiche**.



AUREOMYCIN: A PRODUCT OF THE CONTINUING SEARCH FOR NEW ANTIBIOTICS

By B. M. DUGGAR

Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, N. Y.



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

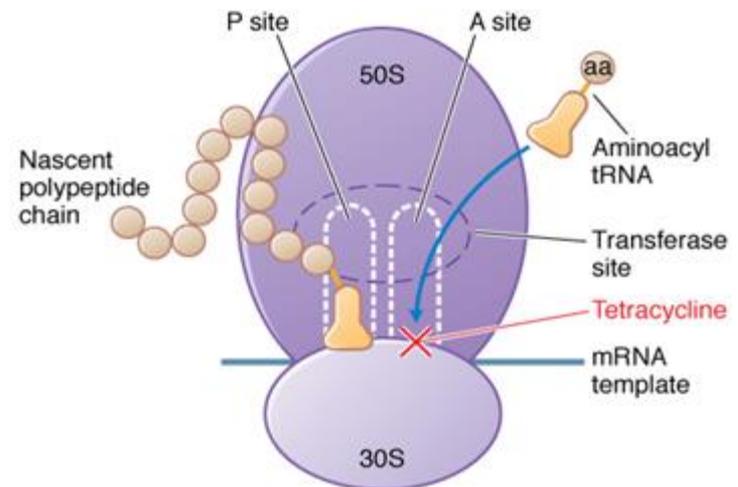
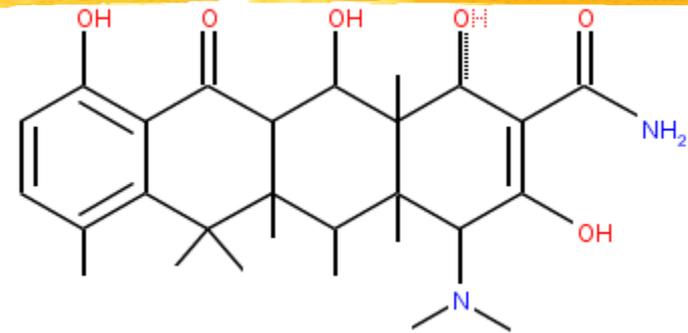
P. Fazii



Tetraciclina

► Le tetraciclina **inibiscono la sintesi proteica** dei batteri **legandosi alla subunità 30S** del ribosoma batterico in modo tale da **impedire l'accesso dell'aminoacil tRNA** al sito accettore (A), presente nel complesso mRNA-ribosomale tetraciclina **bloccano fisicamente** il legame del tRNA al sito accettore (A).

► L'associazione delle **tetraciclina con il ribosoma** è **reversibile** e ciò spiega gli effetti **batteriostatici** di questi antibiotico

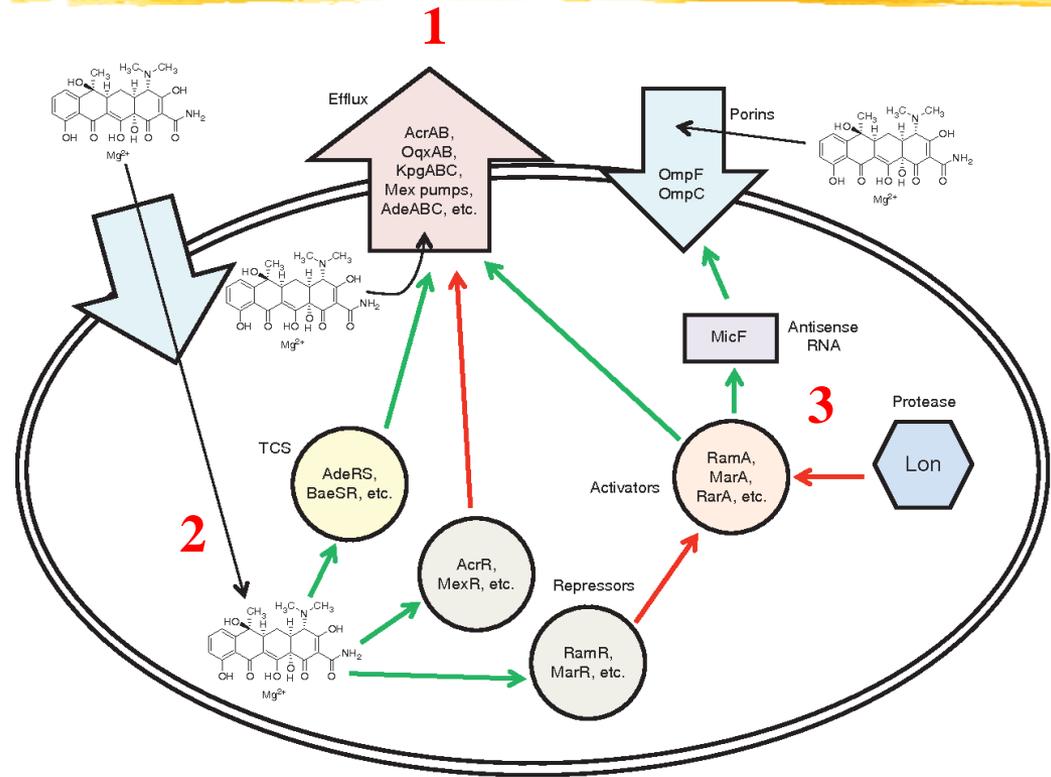


Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Tetraciclina

► I batteri diventano resistenti alle tetraciclina in tre modalità:

- 1) Limitando l'accesso delle tetraciclina ai ribosomi (efflusso)
- 2) Alterando il ribosoma per prevenire l'effettiva legame della tetraciclina
- 3) Producendo enzimi inattivanti le tetraciclina

C.H. RAMSEY and P.R. EDWARDS
Resistance of *Salmonellae* Isolated in 1959 and 1960 to Tetracyclines and Chloramphenicol.
Communicable Disease Center, U.S. Public Health Service, Department of Health, Ed



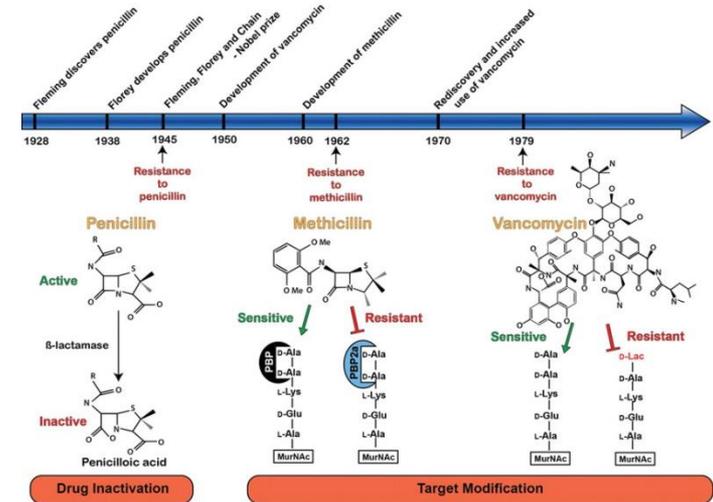
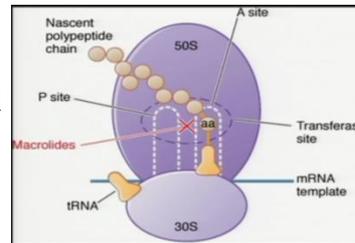
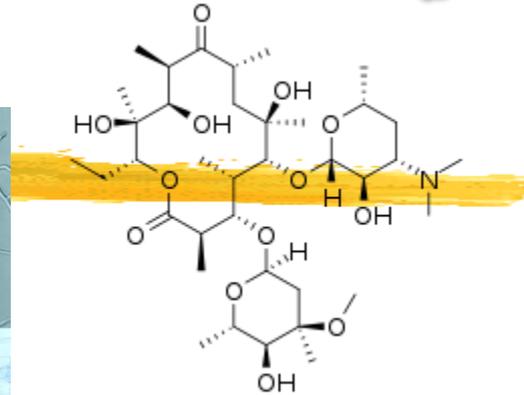
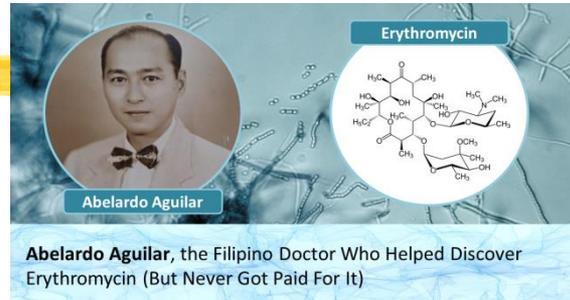
Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



Macrolidi

- ▶ L'**Eritromicina** fu scoperta, nel **1949**, dal filippino **Abelardo Aguilar** quando lavorava per la **Ely Lilly**. Il team di ricerca della Eli Lilly era guidato da **J. M. McGuire**
- ▶ Il team continuò le ricerche arrivando a **depurare** una sostanza, l'**eritromicina** appunto, dai prodotti metabolici di ***Streptomyces erythreus***
- ▶ **Meccanismo d'azione:** inibizione della **sintesi proteica bloccando il meccanismo di traslazione dei t-RNA** che portano gli **amminoacidi** all'interno del ribosoma, L'eritromicina si lega alla **subunità 50s** del ribosoma
- ▶ Lilly brevettò la molecola che fu **commercializzata nel 1952** con il nome di **Ilosone** (dalla regione filippina di **Iloilo**).
- ▶ Le prime segnalazioni di resistenze si ebbero in **Francia, Inghilterra, Giappone e negli USA** subito dopo il 1953



- ▶ **Meccanismi di resistenza**

 - 1) **Modificazione del target** che **previene** il legame del macrolide con il ribosoma
 - 2) **Pompa di efflusso**
 - 3) **Inattivazione** dell'antibiotico



McGUIRE JM, et al. *Ilotycin, a new antibiotic*. Antibiot Chemother (Northfield). 1952 Jun;2(6):281-3.

WISE RI et al. *Origin of erythromycin-resistant strains of Micrococcus pyogenes in infections; bacteriophage types and in vitro resistance of cultures to antibiotics*. Arch Intern Med. 1955 Mar;95(3):419-26.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Meticillina

► La meticillina fu sviluppata da **Beecham in 1959**, introdotta nell'uso **clinico nel 1960**. Essa veniva usata nelle infezioni gravi causate da **batteri Gram +**, in particolare in microorganismi produttori di Penicillinasi, come lo ***Staphylococcus aureus***, che, a quel tempo, era resistente a numerose penicilline

► La meticillina **inibisce la sintesi del cell wall** batterico agendo sul peptidoglicano **inibendo le Penicillin Binding Proteins**

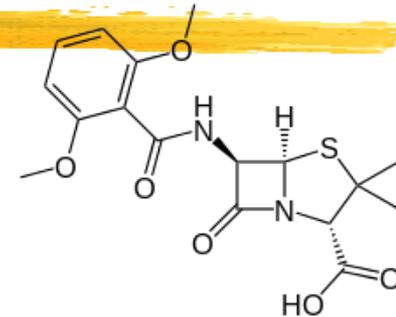
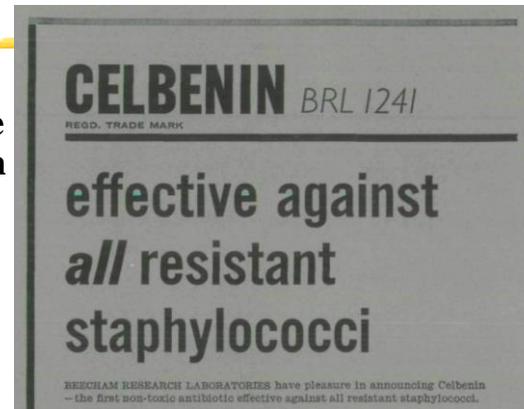
► La **resistenza alla Meticillina**: il gene di resistenza (**mec A**) **codifica una PBP** che non è presente nei ceppi suscettibili.

► Già **nel 1961**, furono segnalati ceppi di ***S.aureus* Meticillino-R (MRSA)**

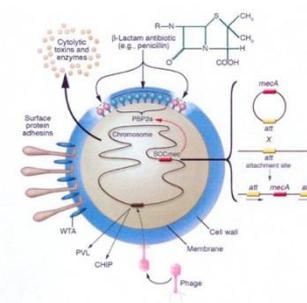
► Il gene **mec A** è portato su un **elemento genetico mobile** chiamato **Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec)**

Peacock JE Jr, Marsik FJ, Wenzel RP.
**Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:
introduction and spread within a hospital.**
Ann Intern Med. 1980 Oct;93(4):526-32.

M. Patricia Jevons. "**Celbenin**" - resistant
Staphylococci. Br Med J. 1961 Jan
14; 1(5219): 124-125



MRSA – mechanism – I



- Horizontally transferred DNA element - SCCmec.
- Site specific recombination.
- mecA gene encodes PBP2a.
- PBP2a = 78 KDa PBP - capable of cell wall synthesis.
- PBP2a has low affinity for all β -lactams.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



Glicopeptidi

► Negli anni '50 con poche opzioni disponibili per trattare gli stafilococchi penicillina-resistenti, Eli Lilly and Company iniziarono un programma di ricerca di antibiotici con attività nei confronti di questi patogeni

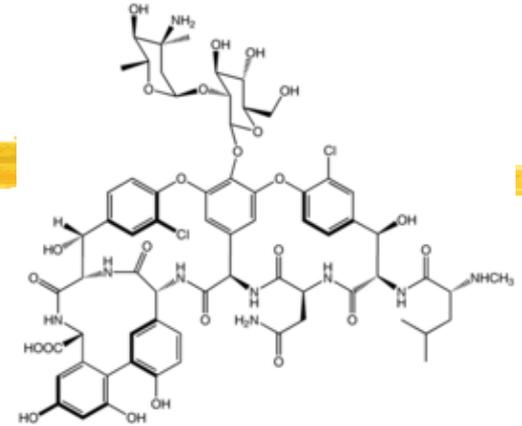
Anderson RCGR, Higgins HM Jr, Pettinga CD.

Symposium: how a drug is born. Cincinatti J Med 1961; 42:49-60.

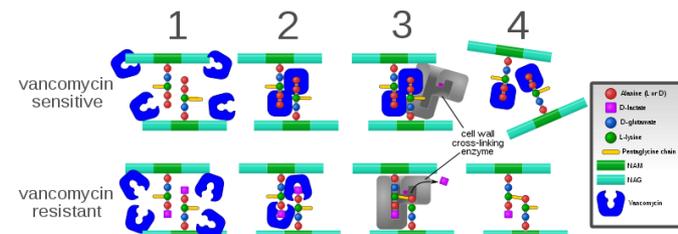
► Nel 1952 un missionario del Borneo portò un campione di terriccio al suo amico Dr. E. C. Kornfield, chimico presso la Lilly.



► Un organismo isolato dal terriccio, *Streptomyces orientalis*, produceva una sostanza ("compound 05865") che aveva attività nei confronti di batteri Gram +, inclusi gli stafilococchi penicillina-Resistenti; di conseguenza la "vancomicina" (dall parola "vanquish"), fu resa disponibile per trials clinici.



► **Meccanismo d'azione.** La vancomicina è in grado di legarsi tenacemente al dipeptide D-Ala-D-Ala che costituisce la parte terminale del pentapeptide del peptidoglicano. La modificazione sterica risultante comporta una compromissione dei meccanismi enzimatici (transpeptidasi) che stabiliscono i legami crociati della parete cellulare batterica. Il risultato finale è simile a quello provocato dalle penicilline, con distruzione della parete e lisi batterica



Storia della resistenza ai farmaci

P. Fazii



antibatterici Glicopeptidi

R. Leclercq, E et al.
Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in Enterococcus Faecium
N Engl J Med 1988; 319:157-161

Noble WC et al.
Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett. 1992;93:195- 8

Hiramatsu K et al. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.* J Antimicrob Chemother. 1997;40:135–136. (primo caso osservato di VISA)

CDC, *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin—United States,* 2002. MMWR. 2002;51:565- 7

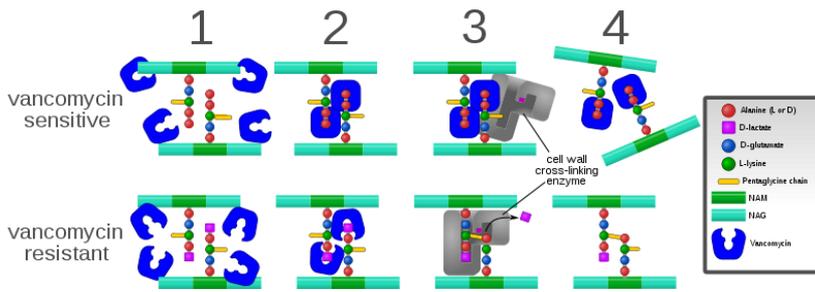
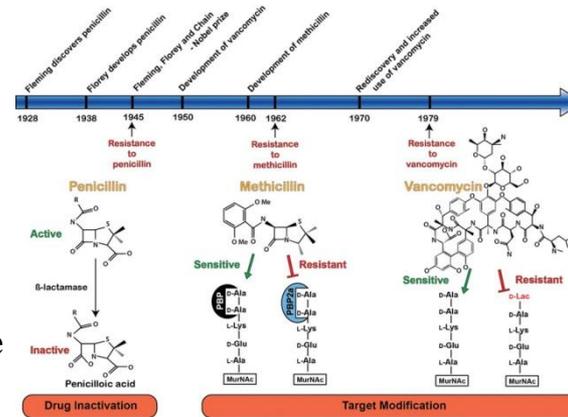
► Nel 1988 prima osservazione di **Vancomicina – resistenza in enterococchi**

► Successivamente l'emergenza di vancomicina-resistenza di **Staphylococcus aureus (VRSA)** (*minimum inhibitory concentration [MIC] ≥32 µg/mL*) è stata anticipata

► La possibilità di **trasferire** il gene di resistenza **Van A** dall'*Enterococcus faecalis* allo *S. aureus* fu dimostrata in laboratorio nel 1992.

► La prima **infezione clinica da VRSA** fu descritta nel 2002

► I **meccanismi alla base della resistenza** sono analoghi per *Staphylococcus* e per *Enterococcus*; viene infatti **sostituito l'aminoacido D-Ala terminale con un residuo di D-lattato**, con perdita dell'affinità per la vancomicina.



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Rifampicina

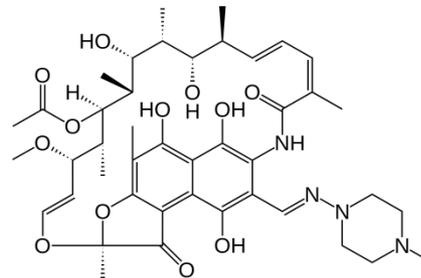
P. Fazii



► Il gruppo delle rifamicine, e la rifampicina in particolare, sono state scoperte **nel 1959** nei laboratori **Lepetit** a Milano grazie alla terra trovata a **Saint-Raphaël**, in Costa Azzurra, dal **microbiologo Ermes Pagani** (1929-2013). I batteri presenti nel terreno (*Streptomyces spp*) sono stati poi analizzati da un gruppo di ricercatori italiani guidati dallo stesso Ermes Pagani, dal **Prof. Piero Sensi** (1920-2013) e dalla **Dott.ssa Maria Teresa Timbal** (1925-1969). La rifampicina è registrata a nome di entrambi.



► Il suo nome deriva **dall'abitudine che i ricercatori** della Lepetit avevano di **denominare ogni campione di terra raccolto con il nome di un film**. In questo caso **Rififi**.



► **Rifampicina** è stato venduto per la prima volta **in Italia nel 1968** ed è stato approvato dalla **FDA nel 1971**.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



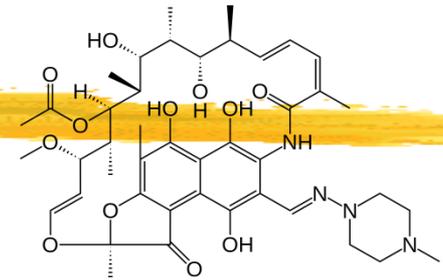
Rifampicina

► La rifampicina è un polichetone appartenente alla classe chimica dei composti denominati **ansamicine**, così denominati a causa della loro **struttura eterociclica** contenente un nucleo di naftochinone attraversato da una catena alifatica. Il **cromoforo nafochinonico** è ciò che conferisce alla rifampicina il suo caratteristico **colore cristallino rosso-arancio**.

► I gruppi funzionali critici della rifampicina, nel suo legame **inibitorio della RNA polimerasi batterica**, sono i quattro gruppi idrossilici critici e gli anelli naftalinici, che formano legami idrogeno con residui amminoacidici

► È un **composto semisintetico** derivato dalla *Amycolaptosis rifamycinica* (conosciuta in passato come *Amycolaptosis mediterranei* o *Streptomyces mediterranei*).

► **Mutazione cromosomica dell' RNA polimerasi DNA-dipendente.**



Chemotherapy 14: 93-100 (1969)

Development of Drug Resistance to Rifampicin

A. MANTEN and L. J. VAN WIJNGAARDEN
Laboratory of Chemotherapy,
National Institute of Public Health, Utrecht

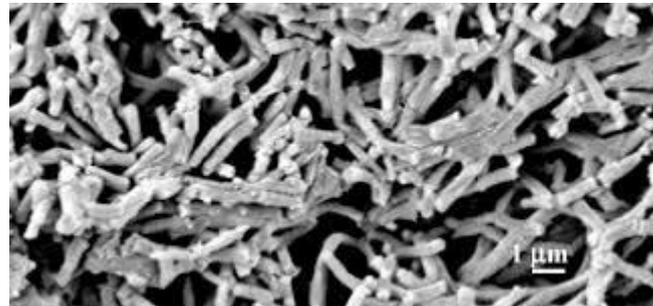
The new semisynthetic antibiotic rifampicin may become an important drug in the treatment of tuberculosis and many other bacterial infections.

As seen from several reports, the new agent combines many favourable bacteriological, pharmacological and toxicological properties. *In vitro* it has a high activity with a wide range of pathogenic bacteria, including specimens that often present problems in antimicrobial therapy, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, and *Mycobacteria* [ARIOLI *et al.*, 1967; PALLANZA *et al.*, 1967; VERBIST, 1967; CLARK and WALLACE, 1967]. Furthermore, rifampicin appears to be a bactericidal agent [ARIOLI *et al.*, 1967; MANTEN, 1967; PALLANZA *et al.*, 1967]. There is no cross-resistance with antibiotics outside the group of rifamycines.

Clinical trials with rifampicin in human pulmonary tuberculosis have revealed the great value of the drug [VERBIST *et al.*, 1967; PINES, 1967; PALLANZA *et al.*, 1967; NITTI *et al.*, 1967]. Even cases of far advanced multidrug-resistant tuberculosis have been successfully treated with it. However, data on the development of bacterial resistance to rifampicin are scarce at the moment. Since, especially in the chemotherapy of tuberculosis, this information is needed, we carried out some experiments with the new drug. The main results of these are reported below.

Drug-Resistant and Drug-Sensitive Species of Mycobacteria

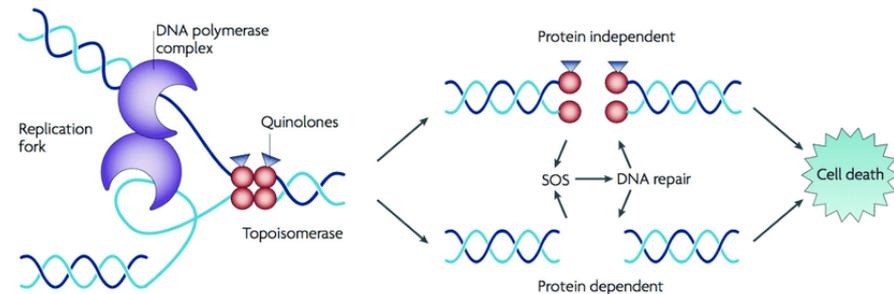
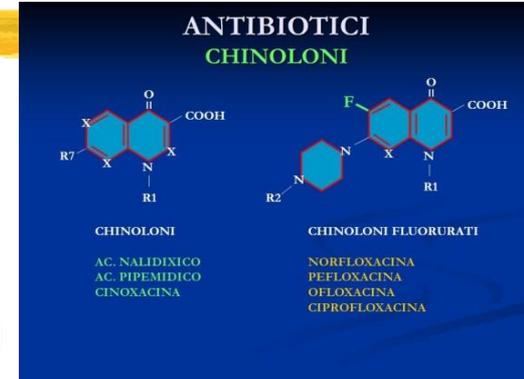
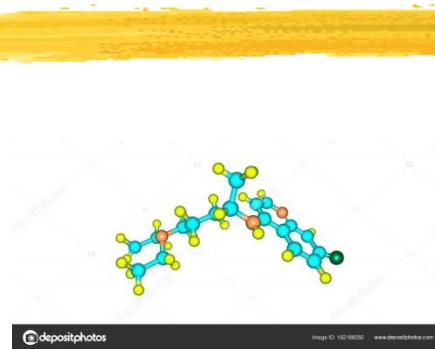
Strains of the so-called atypical mycobacteria have been collected in our institute over several years. From each of the groups representatives were



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Chinoloni

- ▶ I **chinoloni** sono farmaci ad uso locale e sistemico di origine sintetica introdotti nell'uso clinico dalla **fine degli anni cinquanta**. Un gruppo di ricerca, **durante la sintesi della cloroquina**, isolò un **composto chinolonico**, avente proprietà **antibatterica**.
- ▶ Nell'uso comune vengono definiti antibiotici **ma, in senso stretto**, non potrebbero essere inclusi in questa classe perché non sono molecole di origine naturale **ma solo di sintesi**, quindi possono essere **definiti chemioterapici**
- ▶ Tutti i composti chinolonici inibiscono l'**azione di due enzimi** appartenenti alla **classe delle topoisomerasi**, ovvero l'enzima **girasi** e la **topoisomerasi IV**; entrambi sono coinvolti **nell'isomerizzazione spaziale dell'alfa-elica** (DNA girasi) e nel **mantenimento della separazione** tra il filamento stampo e il filamento inerte nel processo di replicazione batterica. (**risaldano il filamento**).
- ▶ Nei batteri **Gram positivi** interagisce specificamente con la **topoisomerasi IV** che separa i due filamenti di DNA nella fase di replicazione.
- ▶ La **Ciprofloxacina** fu brevettata da **Bayer nel 1980** e prodotta a partire dal **1987**
- ▶ La **Levofloxacina** fu brevettata nel **1985** ed approvata per l'uso medico nel **1996**, negli USA



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Chinoloni

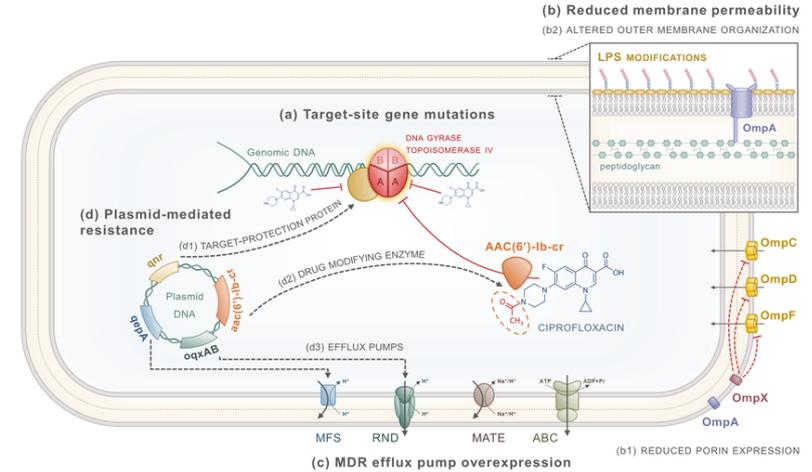
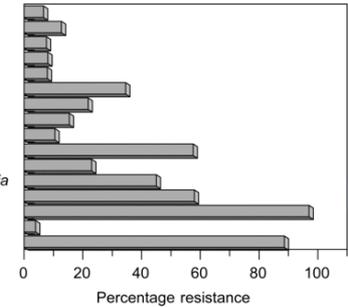
► La resistenza ai chinoloni è dovuta principalmente a:

- 1) Mutazioni puntiformi del gene della girasi;
 - 2) Mutazioni nei geni che codificano per le porine, proteine di membrana mediante le quali i chinoloni penetrano nei batteri Gram-;
 - 3) Mutazioni che riducono i lipopolisaccaridi
 - 4) La resistenza ai chinoloni può anche essere mediata da plasmidi che producono la *Qnr* protein che proteggono il target dei chinoloni dall'inibizione
- Il plasmide *Qnr* è stato trovato negli USA, in Europa e nell'Est-asiatico

-Sebbene il *Qnr* produce un livello di resistenza basso, la sua presenza garantisce al batterio un alto livello di resistenze da mutazioni

-Il meccanismo di resistenza ai chinoloni, plasmide-mediato fu scoperto in un isolato clinico di *K. pneumoniae*, in Alabama, in *E. coli* ed in altri Gram -.

- Enterobacter aerogenes
- Enterobacter cloacae
- Escherichia coli
- Klebsiella oxytoca
- Klebsiella pneumoniae
- ESBL*
- Morganella morganii
- Proteus mirabilis
- Serratia marcescens
- Acinetobacter baumannii
- Pseudomonas aeruginosa
- Stenotrophomonas maltophilia
- Enterococcus species
- VRE
- Staphylococcus aureus
- MRSA



Gellert M et al. *DNAgyrase: An enzyme that introduces super helical turns in to DNA (Escherichiacoli/ATP-dependentre action/super helix density)*
Proc Natl Acad Sci USA. 1976 Nov;73(11):3872-6

Martínez-Martínez L et al.
Quinolone resistance from a transferable plasmid.
Lancet. 1998 Mar 14;351(9105):797-9.

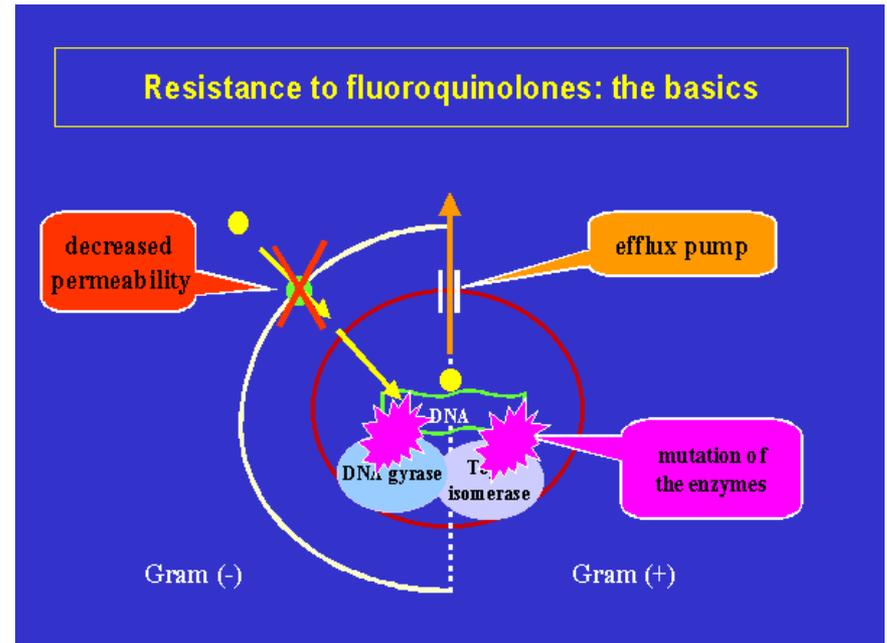
Humphreys H, Mulvihill E.
Ciprofloxacin-resistant Staphylococcus aureus.
Lancet. 1985 Aug 17;2(8451):383.

Chapman ST et al.
Resistance to ciprofloxacin.
Lancet. 1985 Jul 6;2(8445):39.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Chinoloni

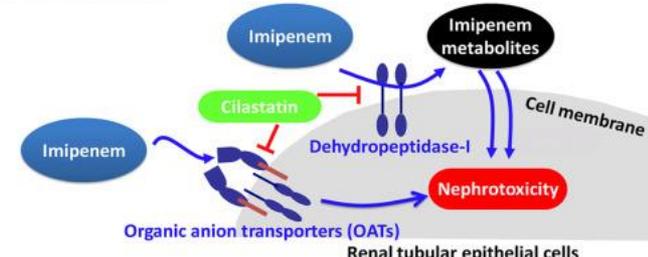
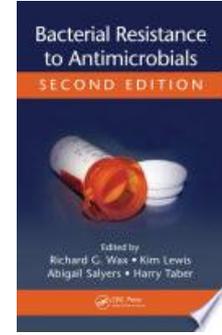
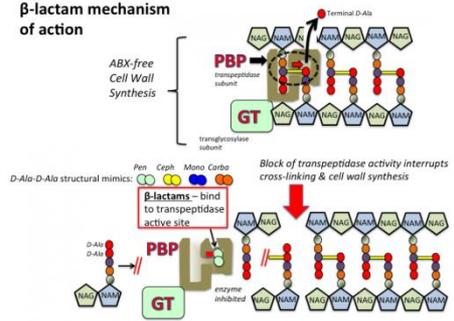
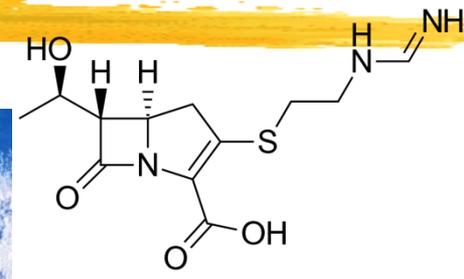
- ▶ L'ampio uso di chinoloni è stato seguito da emergenza di resistenze dovute, principalmente, alle mutazioni cromosomiche nei geni codificanti le subunità degli enzimi target dei chinoloni, la DNA girasi (1) e la Topoisomerasi IV (2) e nei geni che regolano il sistema di efflusso (3)
- ▶ Le resistenze emersero nelle specie in cui una singola mutazione era sufficiente a determinare livelli importanti di resistenza (come: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*).
- ▶ I chinoloni vennero introdotti alla fine degli anni '60
- ▶ Sebbene la resistenza ai chinoloni fu descritta prima della loro introduzione, il meccanismo di resistenza ai chinoloni fu confermato solo nel 1998



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Carbapenemi



- ▶ L'**Imipenem** è un β -lattamico scoperto dai ricercatori della Merck, **Burton Christensen, William Leanza, e Kenneth Wildonger** a metà degli anni '70
- ▶ Fu scoperto **per errore**, nella ricerca di una **stabile** versione dell'antibiotico **naturale Tienamicina**, prodotto dal batterio filamentoso ***Streptococcus cattleya***
- ▶ Imipenem fu **brevettato nel 1975** e approvato per uso medico nel **1985**
- ▶ L'Imipenem agisce **inibendo la sintesi del cell wall** di vari batteri **Gram + e Gram -**
- ▶ Esso viene **metabolizzato a livello renale** dalla **diidropetidasi**, con produzione di un metabolita **tossico**; per tale motivo viene **somministrato con la cilastatina**, che è un **inibitore** del suddetto **enzima**;
- ▶ Il **Meropenem**, **non produce metaboliti tossici** e, di conseguenza, viene **somministrato senza cilastatina**; esso è stato commercializzato **negli USA nel 1996**



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Carbapenemi

► All'epoca nessuna delle lattamasi di Classe A e C erano in grado di inattivare l'Imipenem in maniera efficiente

► Solo rari batteri in grado di produrre metallo—beta-lattamasi (Classe B) erano in grado di idrolizzare l'Imipenem rapidamente (soprattutto *Stenotrophomonas maltophilia*)

► La IMI – beta-lattamasi fu evidenziata in un ospedale californiano prima della commercializzazione dell' Imipenem

► I meccanismi di resistenza ai carbapenemi includono:

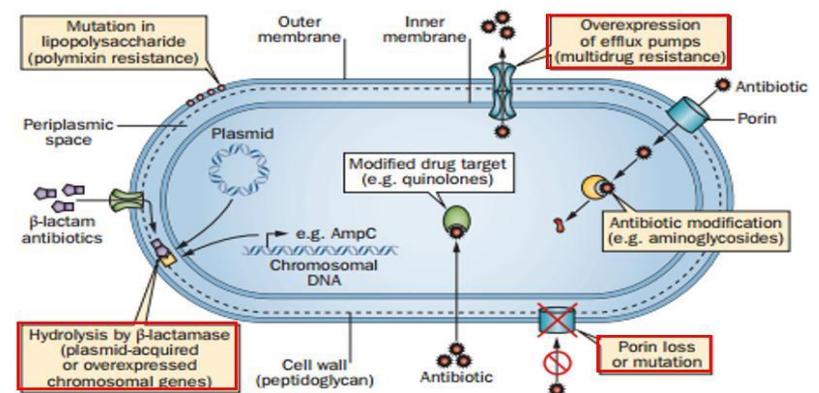
- 1) Produzione di beta-lattamasi
- 2) Pompe di efflusso
- 3) Mutazioni espressione e funzione di porine e di PBP

► La combinazione di questi meccanismi può causare alti livelli di resistenza ai carbapenemi in certe specie batteriche quali *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Acinetobacter baumannii*

CARBAPENEMASES

Classification	Enzyme	Most Common Bacteria
Class A	KPC, SME, IMI, NMC, GES	Enterobacteriaceae (rare reports in <i>P. aeruginosa</i>)
Class B (metallo-β-lactamase)	IMP, VIM, GIM, SPM	<i>P. aeruginosa</i> Enterobacteriaceae <i>Acinetobacter</i> spp.
Class D	OXA	<i>Acinetobacter</i> spp.

Mechanisms of Carbapenem Resistance



Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Carbapenemi

► In isolati clinici Imipenem-resistenti di *Enterobacter cloacae* e di *Enterobacter aerogenes* sono state osservate le produzioni di **3- beta-lattamasi cromosomiali** che causano **descescente permeabilità di Imipenem** a causa di **mutazioni riguardanti le porine (A) di membrana (A. Raimondi e coll., 1991; altri lavori)**, dell'attivazione di **beta 3-lattamasi nello spazio periplasmico** capace di **inattivare Imipenem** prima che riesca a **raggiungere** il suo **sito target** nella membrana citoplasmatica **(B) (Ehrhardt AF & CC Sanders, 1993)**

► Nel **1988 una metallo-lattamasi** in grado di idrolizzare i carbapenemi viene evidenziata in **Giappone**; un isolato clinico di *Pseudomonas aeruginosa* (GN17203), si dimostrò **altamente resistente all'Imipenem** (MIC, 50 pg/mL).

CARBAPENEMASES

Classification	Enzyme	Most Common Bacteria
Class A	KPC, SME, IMI, NMC, GES	Enterobacteriaceae (rare reports in <i>P. aeruginosa</i>)
Class B (metallo-β-lactamse)	IMP, VIM, GIM, SPM	<i>P. aeruginosa</i> Enterobacteriaceae <i>Acinetobacter</i> spp.
Class D	OXA	<i>Acinetobacter</i> spp.

Dr. T.V. Rao MD

36

Raimondi A, et al. *Imipenem- and meropenem-resis-tant mutants of Enterobacter cloacae and Proteus rettgeri lack porins*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1174-80.

Ehrhardt AF, Sanders CC. */3-Lactam resistance amongst Enterobacterspecies*. J Antimicrob Chemother 1993; 32(suppl B):1-11.

Bush K, et al. *Resistance caused by de-creased penetration of /3-lactam antibiotics into Enterobacter cloacae..*Antimicrob Agents Chemother 1985;27:555-60.

Chow JW, Shlaes DM. *Imipenem resistance associated with the lossof a 40 kDa outer membrane protein in Enterobacter aerogenes*. JAntimicrob Chemother 1991;28:499-504.

Lee EH, et al. *of two resistance mechanisms in a clinical isolate of Enterobacter cloacae with high-level resistance to imipenem*. AntimicrobAgents Chemother 1991; 35:1093 -8.

Hopkins JM, Towner KJ. *Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in Enterobacter aerogenes*. J Antimicrob Chemother 1990;25:49-55.

Tzouveleki LS, et al. *Imipenem resistance in Enterobacter aerogenes is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability*. FEMS Microbiol Lett 1992;95:195-200.

Watanabe M, et al. . *Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother1991;35:147-51.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Daptomicina

► La **daptomicina** è un antibiotico lipopeptide usato nel trattamento di gravi infezioni **causate da Gram +**; essa è stata scoperta dai **ricercatori di Eli Lilly** alla fine degli anni '80. Fu approvata per l'uso in soggetti **> 18 anni, nel 2003**

► Trattasi di un composto naturale sintetizzato da *Streptomyces roseosporus*.

► Meccanismo d'azione:

-altera molteplici aspetti della membrana cellulare batterica

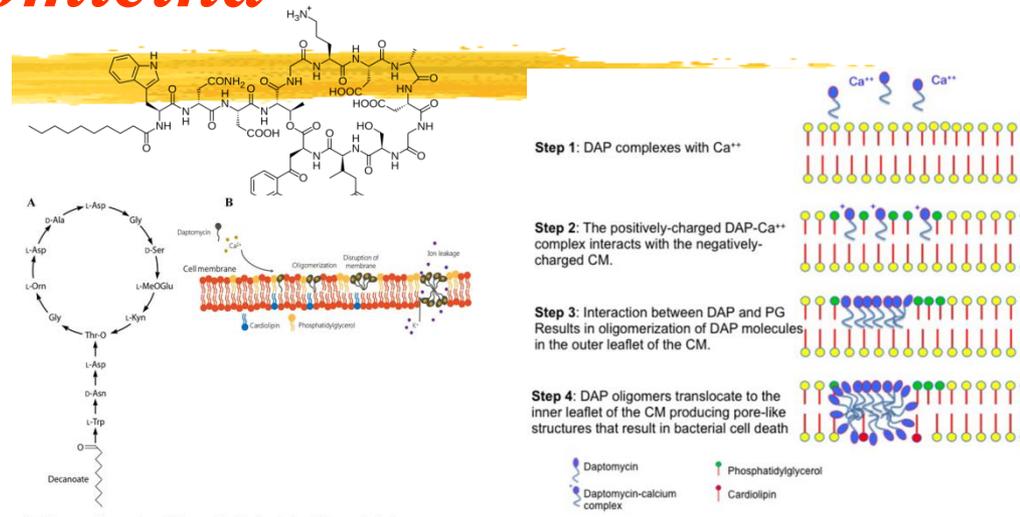
-Si inserisce nella membrana **modificandone la curvatura** che **crea buchi** da cui **fuoriescono** gli ioni

-Ciò determina una **rapida depolarizzazione** che porta a una **perdita delle funzioni** di membrana ed alla **inibizione della sintesi** di proteine, DNA e di RNA con **morte cellulare**.

► Meccanismo di resistenza:

-Studi di **resistenza in laboratorio** nel **2001** (prima della commercializzazione)

-**Prima resistenza segnalata nel 2005** in un soggetto trattato per **batteriemia da MRSA**



Mangili, A., et al.2005. *Daptomycin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia. Clin. Infect.Dis.40:1058–1060*

Silverman, J. A. et al.2001. *Resistance studies with daptomycin. Antimicrob. Agents Chemother.45:1799–1802*

Kerry Cleveland, Michael Gelfand. *Daptomycin-Non susceptible Enterococcal Infections Infectious Diseases in Clinical Practice. 21(3):213, MAY 2013*

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici Daptomicina

P. Fazii



► Meccanismo di resistenza:

► In staphylococci appears to be “repulsion” of the DAP antibiotic molecule from the cell surface, which is generally associated with an overall change in the net charge of the bacterial surface (towards a more positive CM) (Figure 3).

► Role of genes involved in phospholipid metabolism—
Other genes strongly implicated in the development of DAP-R in *S. aureus* are those encoding enzymes involved in phospholipid metabolism (other than MprF).

► Although some environmental, non-pathogenic organisms have been found to harbor enzymes with the ability to hydrolyze and inactivate the DAP molecule, this type of resistance has not been shown in clinically important bacteria to date. However, these genes coding for DAP inactivating enzymes could be a potential source of resistance determinants if they could be captured by pathogenic bacteria, as it has been previously reported

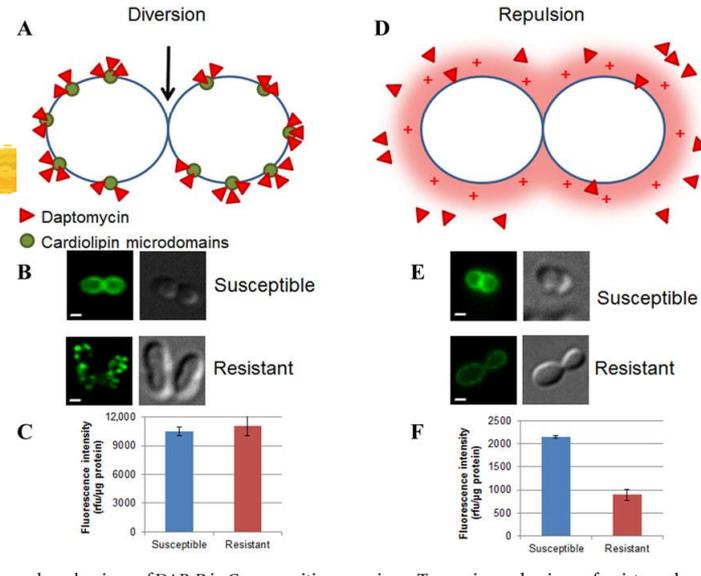
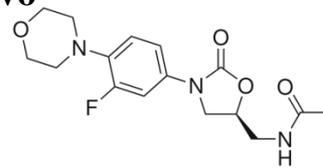


Figure 3. Proposed mechanisms of daptomycin resistance in Gram-positive organisms. Two main mechanisms of resistance have been postulated in enterococci. The first is diversion (*Enterococcus faecalis* only) of the antibiotic from the preferential binding site of DAP at the septum (black arrow) resulting in ineffective binding of DAP (panel a). Images of cells treated with BODIPY-labeled DAP (a fluorescent derivative of DAP) demonstrate binding of the antibiotic to the septum in DAP-S. When exposed to the same concentration, DAP binding does not appear to occur at the septum in a DAP-R isolate (panel b). Panel c evaluates the amount of DAP bound to cell membrane of enterococci by measurement of fluorescence intensity normalized to protein content. As shown, no change in fluorescence intensities were noted between DAP-S and -R, indicating similar binding of the antibiotic molecules to the cell membrane. The second mechanism, seen in *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecium*, is electrostatic repulsion of the positively charged DAP-Ca²⁺ complex from the cell membrane (panel d). Binding of BODIPY-labeled DAP is decreased in DAP-R isolate compared to its -S counterpart (panel e), demonstrated by *E. faecium*. Lower fluorescence intensity is also noted in DAP-R versus DAP-S (panel f) as described in *E. faecium*. DAP – daptomycin; R – resistant; rfu – relative fluorescence unit; S – susceptible. Bar – 1 μ m

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Linezolid

Zurenko G. et al. (1999). *Development of linezolid-resistant Enterococcus faecium in two compassionate use program patients treated with linezolid*. In Proceedings of the Thirty-ninth Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, USA. Abstract 848, p. 117.



Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellerin RC, Ferraro MJ. *Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001 Jul 21;358(9277):207-8.

Linezolid

► Appartiene alla famiglia degli **ossazolidoni**, attivo sui **Gram +**

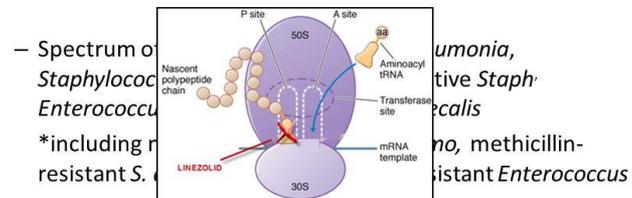
► Un gruppo di chimici dell'Upjohn diretti da **Steven J. Brickner, Michael R. Barbachyn e Douglas K. Hutchinson** sintetizzarono due composti, **eperezolid e linezolid nel 1995**; fra i due, **il linezolid** presentava proprietà farmacocinetiche **migliori** e quindi fu approvato **da FDA** per la **commercializzazione nel 2000**

► Per la terapia di vari **Gram +**, compresi **MRSA e VRE**

► La resistenza **acquisita al Linezolid** è stata riportata per la prima **volta nel 1999** in due pazienti con una severa resistenza poliantibiotica da **Enterococcus faecium**.

► Resistenza da parte dello **Staphylococcus aureus** (LRSA) è stata riscontrata **nel 2001**. Lo **Staphylococcus aureus** resistente al linezolid è stato **isolato per la prima volta nel 2001**.

- Linezolid
 - Mechanism of action: inhibits bacterial protein synthesis by binding to bacterial 23S ribosomal RNA of the 50S subunit preventing the formation of a functional 70S complex required for bacterial translation process



- Spectrum of
Staphylococ
Enterococcu
*including r
resistant S.

Schema semplificato della traduzione dell'mRNA. Il Linezolid occupa il sito A (al centro) e previene il legame con il tRNA.

Storia della resistenza ai farmaci antibatterici

Linezolid

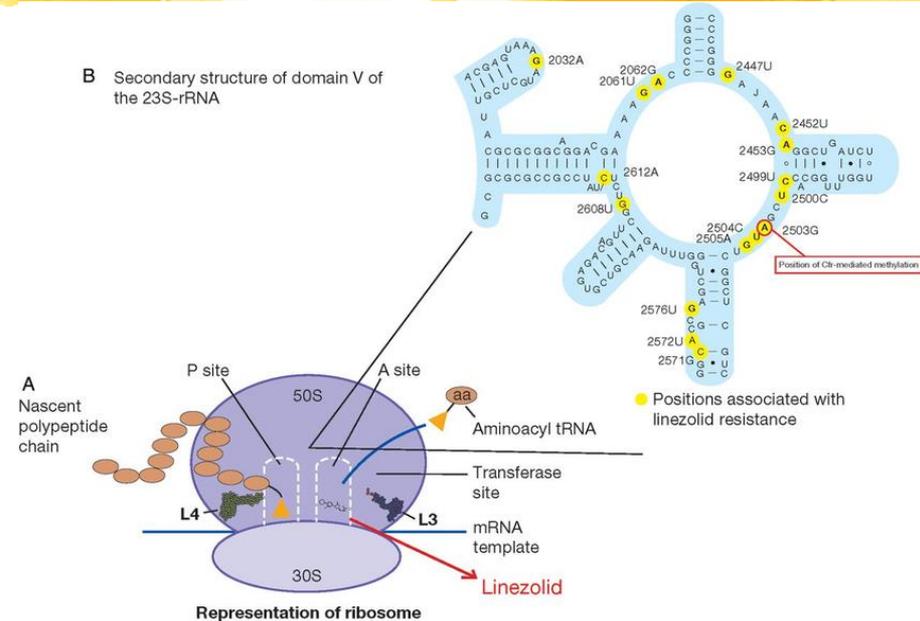
Gram -

► La resistenza **intrinseca** della maggior parte dei microrganismi **Gram-negativi** si basa sulla produzione di **pompe di efflusso che impediscono** il raggiungimento di concentrazioni efficaci all'interno del soma batterico.

Gram +

► I Gram-positivi acquisiscono resistenza tramite **mutazione puntiforme** conosciuta come **G2576T** in cui una guanina è sostituita con una timina nella **2576** del **gene codificante l'RNA ribosomiale 23S**. Questo risulta essere il **più** comune meccanismo di resistenza negli **stafilococchi** e **l'unico isolato** nella prima resistenza degli "*E.faecium*".

► **Altri meccanismi** sono stati identificati nello *Streptococcus pneumoniae* (includo **mutazioni in un RNA metiltransferasi** che metila G2445 nel RNA 23S e mutazioni che causano una maggiore espressione dei geni ABC) e nello *Staphylococcus epidermidis*



Schematic representation of the mechanism of action and resistance to linezolid. A, Linezolid interferes with the positioning of aminoacyl transfer RNA (tRNA) by interactions with the peptidyl transferase center. Ribosomal proteins L3 and L4, associated with resistance, are shown. B, Representation of domain V of 23S ribosomal RNA (rRNA) showing mutations associated with linezolid resistance. Position A2503, the target of Cfr (chloramphenicol-florfenicol resistance) methylation, is highlighted. Abbreviation: mRNA, messenger RNA

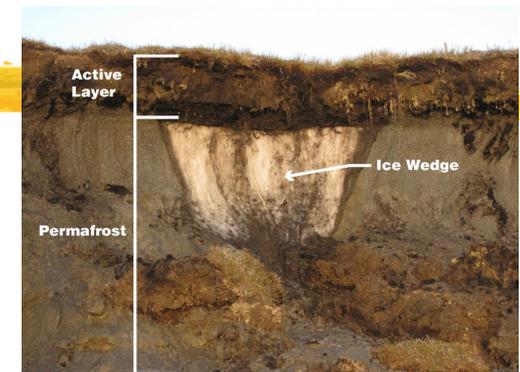
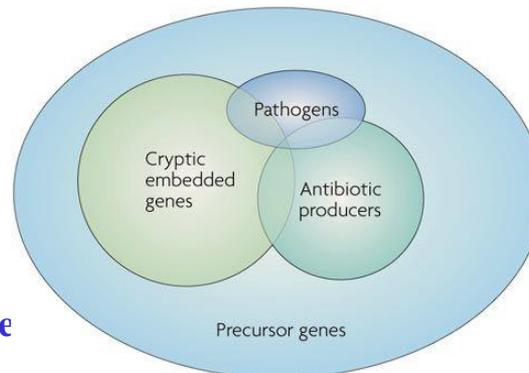
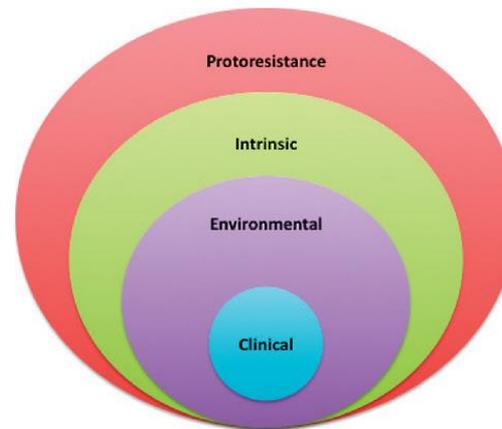
Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii



Il resistoma

- Recentemente, grazie alla biologia molecolare, si è scoperto che i **meccanismi di difesa** nei confronti degli antibiotici sono **ancestrali**
- Studio sui **sedimenti di permafrost** antiche di **30.000** anni hanno evidenziato la presenza di **geni di resistenza (Fattore R)** nei confronti di **numerosi Classi** di antibiotici
- Da batteri **coltivati da grotte** che non avevano subito **contatti** con gli umani per **4 milioni di anni** sono stati evidenziati fenomeni di **resistenza** nei confronti di **14 antibiotici**
- Il microbioma di **indigeni sudamericani** conteneva numerosi geni di **resistenza** agli antibiotici
- La **raccolta di geni di resistenza** in un dato ambiente prende il nome di **resistoma** e contempla da **una parte**, sia i **geni intrinseci** che **acquisiti**, dall'altra i **geni di resistenza silenti** o **criptici**



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Il resistoma

► L'ipotesi del resistoma fu previsto dai "pionieri" Benveniste e Davies nel 1973.

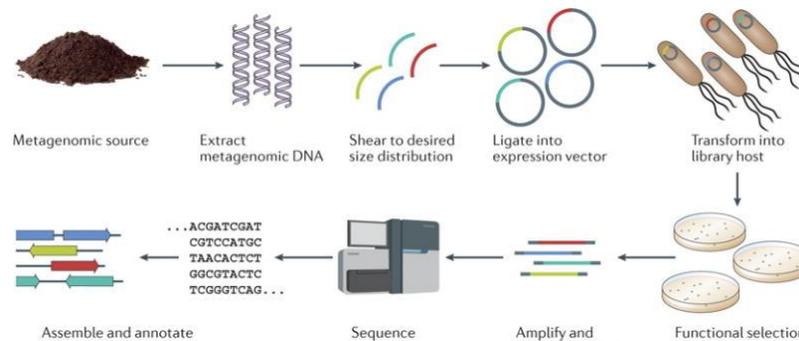
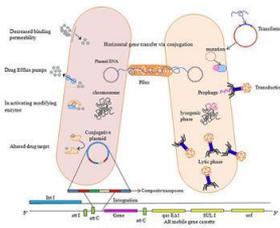
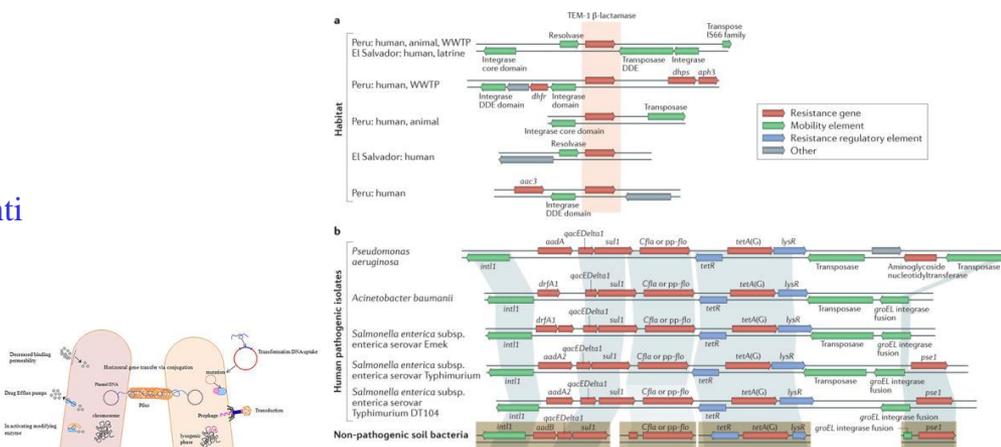
► Essi notarono che dal punto di vista biochimico l'antibiotico resistenza all'acetyl transferasi della Kanamicina di un *Streptomyces* ambientale era praticamente identica a quella osservata in *Escherichia coli*

► Recentemente uno studio che ha screenato i metagenomi presenti nel suolo ha dimostrato che i geni di resistenza evidenziati, avevano la stessa identità nucleotidica (al 99%) dei geni di resistenza presenti nei patogeni

► La sintenia (blocchi genetici conservati) di questi geni di resistenza con altri geni di resistenza e la mobilità degli elementi, suggerisce che essi sono i candidati sia per la passata che, per la futura disseminazione di questi geni, mediante un trasferimento orizzontale

► L'origine antica degli antibiotici e dei geni di resistenza fa sì che l'uso in larga scala di antibiotici in agricoltura ha selezionato numerosi fattori di resistenza

► Studi hanno rilevato che batteri Gram -, relativamente primitivi quali, *Flavobacterium* spp, *Chromobacterium* spp e *Pseudomonas acidophila* possono portare sia lattamici monobattami che lattamasi. Lo stesso si è osservato su batteri filamentosi del suolo (*Streptomyces*, *Nocardia* ed *Actinomadura*) che portano sia lattami (ed alti antibiotici) che lattamasi



```
...ACGATCGAT  
CGTCCATGC  
TAACACTCT  
GGCGTACTC  
TCGGGTCAG...
```

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

P. Fazii

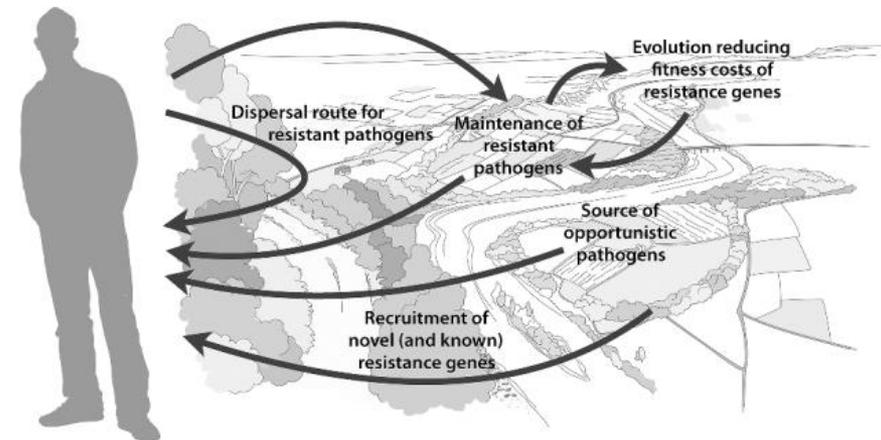


Il resistoma

■ Sono stati condotti studi di screening di metagenomica funzionale su diversi ambienti dove sono stati trovati diversi geni che conferiscono resistenza a diverse classi di antibiotici

- Suolo artico
- Suolo alluvionale
- Suolo di meleti
- Palude
- Suolo di terreno agricolo
- Suolo urbano

■ Il resistoma agricolo è di particolare interesse perché la pressione selettiva esercitata dal pesante uso di antibiotici e l'interazione con gli umani fa sì che sia un habitat ad alto rischio di selezione e di disseminazione di AR.



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

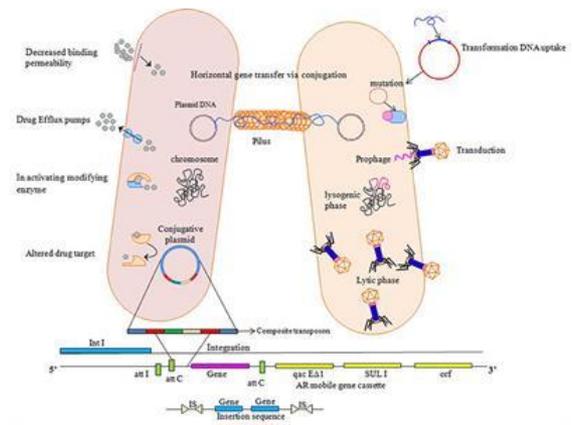
Il resistoma

- La recente diffusione di **mcr1**, **kpc**, **blaNDM1**, **qnr** ed altri determinati di resistenza portati dai plasmidi enfatizza due temi:
 - a) nell' "antibiotic arms race" contro i batteri, l'umanità è raramente avanti; es. la resistenza alla tigeciclina fu evidenziata prima della sua approvazione per l'uso umano
 - b) la miopia nel trattare patogeni e non patogeni con il risultato di avere esteso i geni di resistenza a tutti i batteri
- Lo studio del resistoma ci consentirà di conoscere
 - a) l'ubiquità del l'antibiotico-resistenza,
 - b) di aumentare lo sviluppo di nuovi antibiotici,
 - c) di sorvegliare l'emergenza di eventuali resistenze,
 - d) cercando di concentrarci sui geni di resistenza che più sono candidabili per il trasferimento orizzontale ai patogeni
- Tuttavia la AR che risulta da mutazioni del target come avviene in numerosi microrganismi come il *Mycobacterium tuberculosis* non sempre sono evidenziati dagli screening dei metagenomica funzionale (come invece è accaduto per la mutazione del DNA girasi che ha dato AR ai fluorochinoloni)

Liu YY, et al. *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 China: a microbiological and molecular biological study*. Lancet Infect Dis. 2016; 16:161–168.

Martinez JL, Baquero F. *Mutation frequencies and antibiotic resistance*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:1771–1777.

Pino M et al. *INQ-1, a chromosome-encoded AmpC β -lactamase from Inquilinus limosus*. J Antimicrob Chemother. 2014; 69:560–562.



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Il resistoma

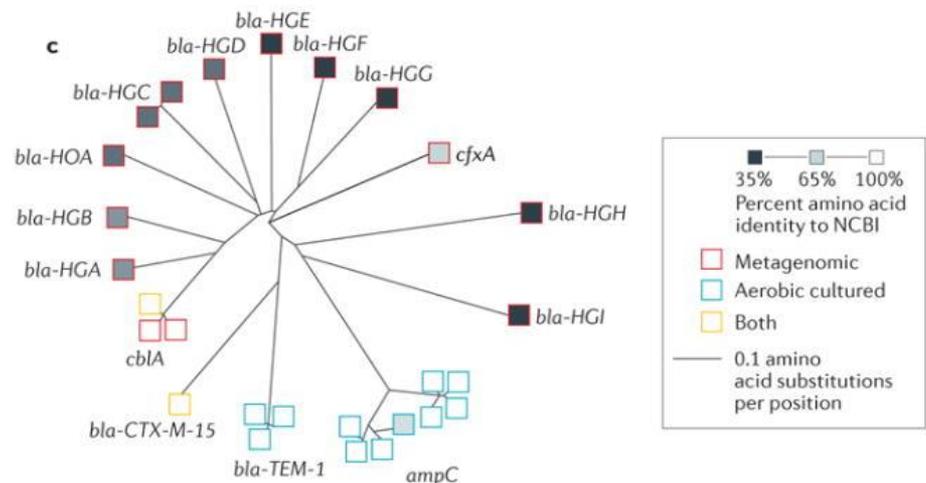
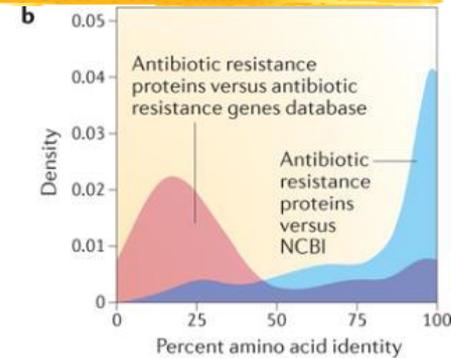
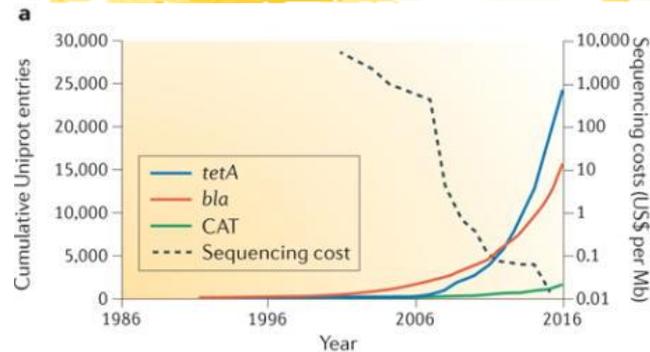
► Questi studi di **metabolomica funzionale** hanno trovato sia **geni di resistenza con alta identità amino-acidica** con gli enzimi già conosciuti così **come bassa identità con alcuni determinati di resistenza**

► Questi studi hanno fatto **scoprire nuove funzioni di resistenza**

-Rifampicina fosforilasi

-Diidrosolfato reduttasi

-Enzimi inattivanti le tetracicline



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Il resistoma

► Studi sui resistomi uomo-associati

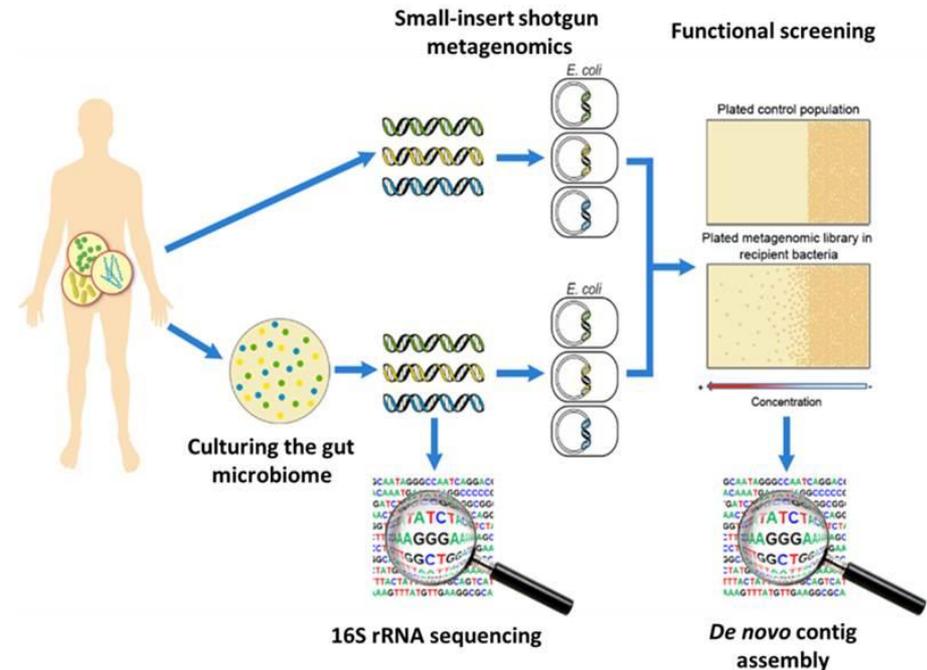
- Resistoma del microbioma orale (saliva e placca dentale) (scoperta del gene *tet* che codifica per un enzima inattivante le tetracicline; evidenziazione di AR nei confronti di tetracicline, gentamicina e amoxicillina)

- Altro studio su microbiota della saliva e delle feci di due soggetti sani: evidenziati geni di resistenza che garantiscono AR Vs 13 antibiotici questi determinanti AR erano diversi da quelli noti: tra essi vi erano anche 10 nuove beta-lattamasi

- Studio di microbioma intestinale di:

- Soggetti sani
- Gemelli e loro madri
- Infanti pre-termine
- Amerindi mai trattati con antibiotici
- Famiglie, animali da allevamento e di compagnia da *developing-countries* dell'America Latina

Risultati comuni: estesi resistomi anche in assenza di uso di antibiotici



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Il resistoma

► Mantenere una prospettiva olistica sull'AR che includa l'uomo, gli animali e l'ambiente, il cosiddetto "One Health approach"

► Alcune volte il microbioma umano presenta un largo numero di geni di resistenza che non sono stati trasferiti ai patogeni

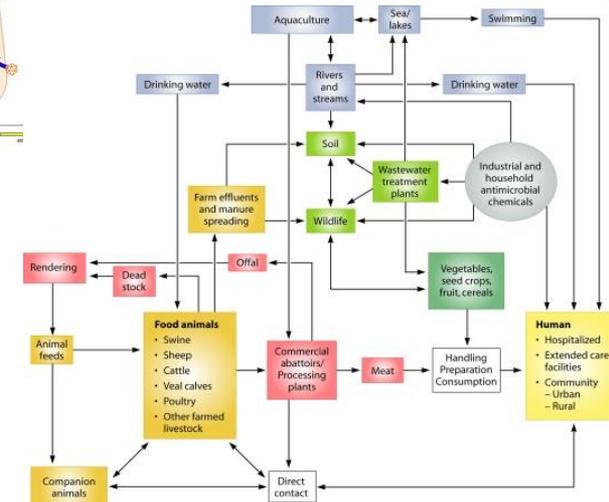
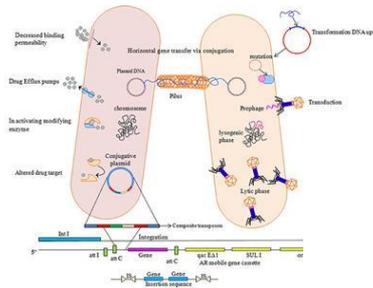
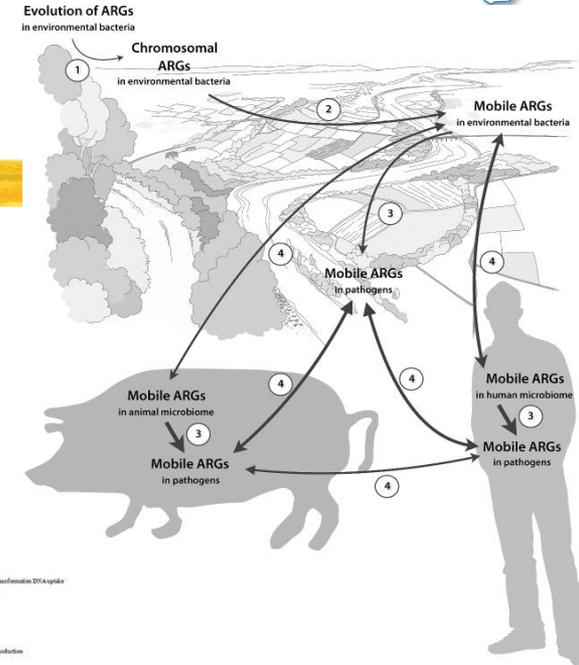
► Al contrario molti anaerobi non coltivabili del microbioma intestinale presentano frazioni di geni non ancora scoperti che conferiscono resistenza agli aminoglicosidi, CAF, beta-lattami e tetracicline

► E' possibile che i batteri ambientali con geni per AR possano essere presenti nel microbioma umano dopo interazione con animali selvaggi, mediante cibi crudi, od acqua da bere contaminata

► Altro terreno predisponente per il trasferimento di resistenze potrebbe essere l'agricoltura, gli allevamenti, l'acqua e le filiere alimentari

► Infine vi è il processo inverso.

-Dai patogeni umani i fattori di resistenza patogeni possono passare all'ambiente consentendo ai batteri umani di usare la popolazione di batteri ambientali come reservoir di geni di resistenza che possono, successivamente essere reclutati come resistoma umano



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Il resistoma

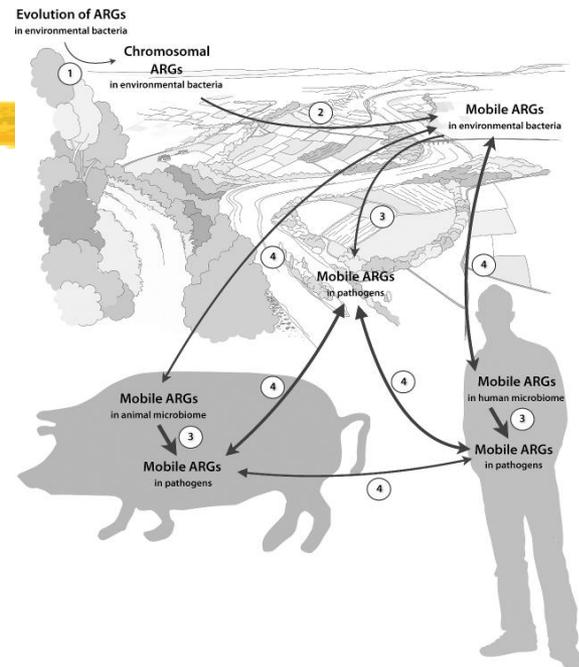
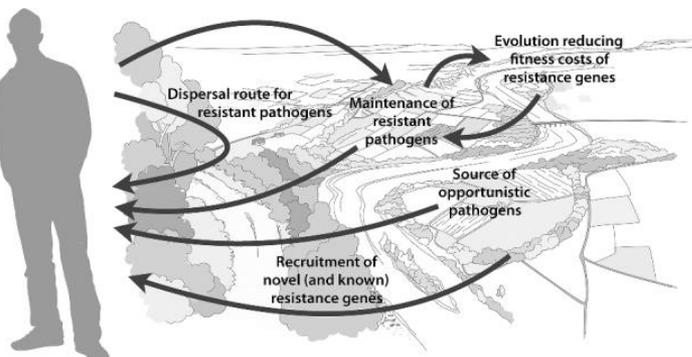
► La ricerca dei determinanti di resistenza nell'ambiente, che non sono ancora diffusi fra i batteri d'importanza clinica, potrebbe rappresentare una componente essenziale nella valutazione del rischio e del management

► Il panorama del rischio può essere diviso in 3 componenti principali:

1) Il rischio della mobilizzazione dei determinanti di R la loro susseguente stabilizzazione come nuovi determinati di R

2) Il rischio di recruitment di geni di resistenza non ancora incorporati dai patogeni umani attraverso l'ambiente

3) Il rischio associato alla disseminazione di batteri resistenti (patogeni e non) dall'ambiente alla popolazione umana



The role of the environment in the recruitment of antibiotic resistance genes (ARGs) to human pathogens includes four major steps: (1) emergence of novel resistance factors in the environment, (2) mobilization onto mobile genetic elements, (3) transfer of ARGs to human pathogens, and (4) dissemination of ARGs into the human microbiome. The width of each arrow roughly corresponds to the assumed frequency of each event, although this is of course largely speculative. Many events are likely more frequent when antibiotic selection pressure is stronger or recurrent. Still, due to the much larger numbers of environmental bacteria than human- and animal-associated, environmental emergence and mobilization of ARGs is probably common on a global scale. Note that the focus of this figure is on the processes involving the external environment.



FEMS Microbiology Reviews, fux053, 42, 2018, 68-80

doi: 10.1093/fems/fux053
Advance Access Publication Date: 24 October 2017
Review Article

REVIEW ARTICLE

Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance

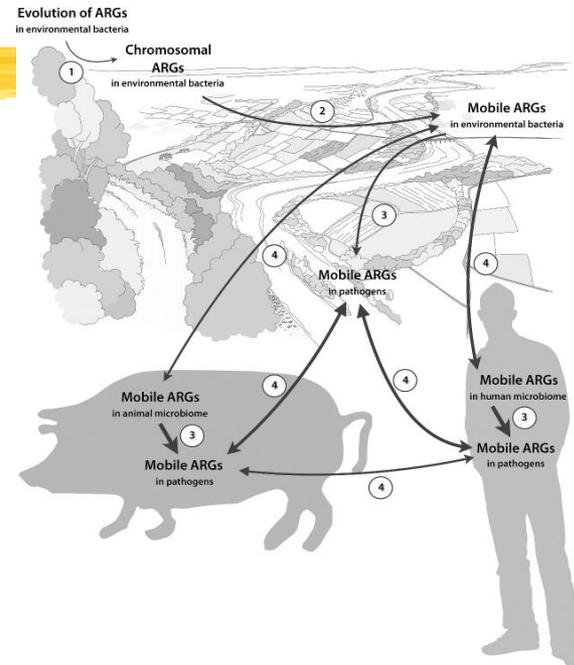
Johan Bengtsson-Palme^{1,2,*}, Erik Kristiansson^{1,3} and D. G. Joakim Larsson^{1,2}

¹Centre for Antibiotic Resistance Research (CARE), University of Gothenburg, Box 440, SE-40530, Gothenburg, Sweden, ²Department of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Guldhedsgatan 10, SE-413 46, Gothenburg, Sweden and ³Department of Mathematical Sciences, Chalmers University of Technology, SE-412 96, Gothenburg, Sweden

*Corresponding author: Department of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Guldhedsgatan 10, SE-413 46, Gothenburg, Sweden. Tel: +46 31 242 46 26; Fax: +46 31 84 41 13; E-mail: johan.bengtsson-palme@microbiology.gu.se
One sentence summary: This review defines which ecological and environmental factors are important for the development of antibiotic resistance in human pathogens, and suggests some possible mitigation strategies to delay and reduce increased resistance.
Editor: Ehsud Bhatti
©Johan Bengtsson-Palme, http://orcid.org/0000-0002-4528-3158

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Il resistoma



- ▶ La possibilità di trasmissione di plasmidi con multi-determinanti di R potrebbe rappresentare un problema importante in futuro
- ▶ Potremmo già essere stati testimoni di ciò essendo stata isolato, ultimamente, una *Klebsiella pneumoniae* MDR negli ospedali cinesi
- ▶ Il microbioma umano può giocare un ruolo importantissimo ed i commensali possono rappresentare gli intermediari di resistenza per i patogeni
- ▶ Gli animali potrebbero agire come ospiti intermedi per i batteri resistenti a contribuire come terreno di sviluppo per il trasferimento di AR ai patogeni umani
- ▶ Inoltre è importante l'identificazione e la riduzione delle vie di trasmissione



FEMS Microbiology Reviews, fux053, 42, 2018, 68–80

doi: 10.1093/femsre/fux053
Advance Access Publication Date: 24 October 2017
Review Article

REVIEW ARTICLE

Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance

Johan Bengtsson-Palme^{1,2,*}, Erik Kristiansson^{1,3} and D. G. Joakim Larsson^{1,2}

¹Centre for Antibiotic Resistance Research (CARE), University of Gothenburg, Box 440, SE-40530, Gothenburg, Sweden, ²Department of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Guldhedsgatan 10, SE-412 46, Gothenburg, Sweden and ³Department of Mathematical Sciences, Chalmers University of Technology, SE-412 96, Gothenburg, Sweden

*Corresponding author: Department of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Guldhedsgatan 10, SE-412 46, Gothenburg, Sweden. Tel: +46-31-342-46-26; Fax: +46-31-84-41-13; E-mail: johan.bengtsson-palme@microbiology.gu.se
One sentence summary: This review defines which ecological and environmental factors are important for the development of antibiotic resistance in human pathogens, and suggests some possible mitigation strategies to delay and reduce increased resistance.

Editor: thud basin
Johan Bengtsson-Palme, <http://orcid.org/0000-0002-4528-3158>

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

► Nel prossimo futuro bisognerà prendere provvedimenti per scongiurare l'avanzata di MDRO sempre più diffusi ed aggressivi:

- 1) Limitare la pressione selettiva dei patogeni umani mediante un oculato uso di antibiotici nell'uomo e negli animali
- 2) Sviluppare nuove generazioni di sostanze ad azione antibiotica
- 3) Valutare nuove strategie:
 - a) peptidi antimicrobici
 - b) terapia fagica
 - c) fitochimici
 - d) metallo-antibiotici
 - e) inibitori del liposaccaride
 - f) inibitori della pompa d'efflusso
 - g).....
 - h).....
 - i).....

UOMINI, ANIMALI E ANTIBIOTICI:
UN TRIANGOLO "PERICOLOSO"

GIOVEDÌ 9 MARZO 2017



frontiers in
PHARMACOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 13 May 2014
doi: 10.3389/fphar.2014.00105



Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization

Santi M. Mandal^{1*}, Anupam Roy^{1†}, Ananta K. Ghosh¹, Tapas K. Hazra², Amit Basak¹ and Octavio L. Franco^{3*}

¹ Central Research Facility, Department of Chemistry and Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Kharagpur, Kharagpur, India

² Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, USA

³ Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

a) **ANTIMICROBIAL PEPTIDES (AMPs)**

- ▶ Numerosi sono gli AMPs individuati e studiati fra le piante, gli umani, gli insetti ed altri invertebrati, anfibi, uccelli, pesci e mammiferi
- ▶ Molti AMPs posseggono una conformazione anfipatica sono piccoli (< 100 amminoacidi)
- ▶ Inibirebbero la formazione dei setti di membrana, la sintesi della membrana cellulare, verrebbero portati agli acidi nucleici con inibizione dell'acidosintesi nucleica, impedimento alla sintesi proteica, inibizione dell'attività enzimatica

▶ Potrebbero essere utilizzati come:

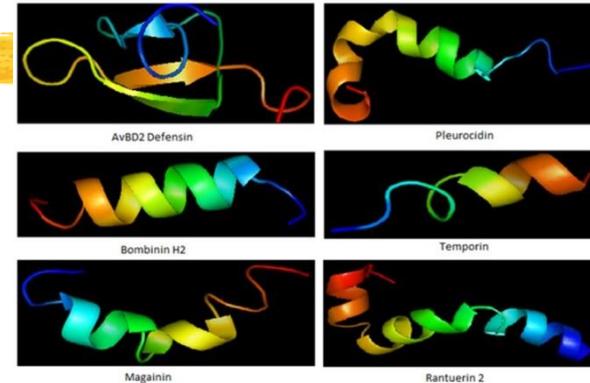
- Nuove classi di antibiotici
- Complementari agli antibiotici convenzionali

▶ Alcuni AMPs potrebbero essere nanoincapsulati mediante strategie che includono:

- Autoassemblamento
- Liposomi
- Strutture polimeriche
- Idrogel
- Polimeri dendritici
- Nanosfere
- Nanocapsule
- Nanotubi di carbonio
- Gabbie di DNA

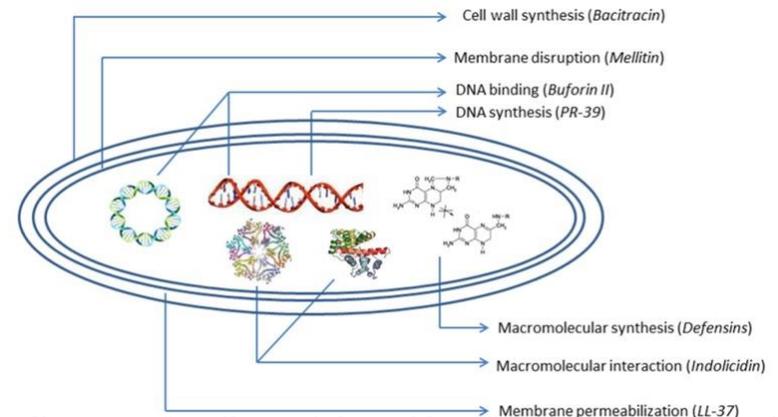
▶ Queste strategie offrirebbero

- Aumentata attività antimicrobica
- Riduzione degli effetti collaterali
- Protezione nei confronti della degradazione metabolica



Some representative structure of antimicrobial peptides.

Structure represents beta defensin peptide from avian (AvBD2); an amphipathic alpha-helical peptide from skin mucous of Pleuronectes americanus (Pleurocidin); an antimicrobial hemolytic peptide from skin of Bombina variegata (bombinin H2); skin secretion of Rana temporaria (temporin); another antimicrobial peptide frog Xenopus laevis (Magainin) and peptide with helix-turn-helix motif from Rana cascadae (rantuerin)



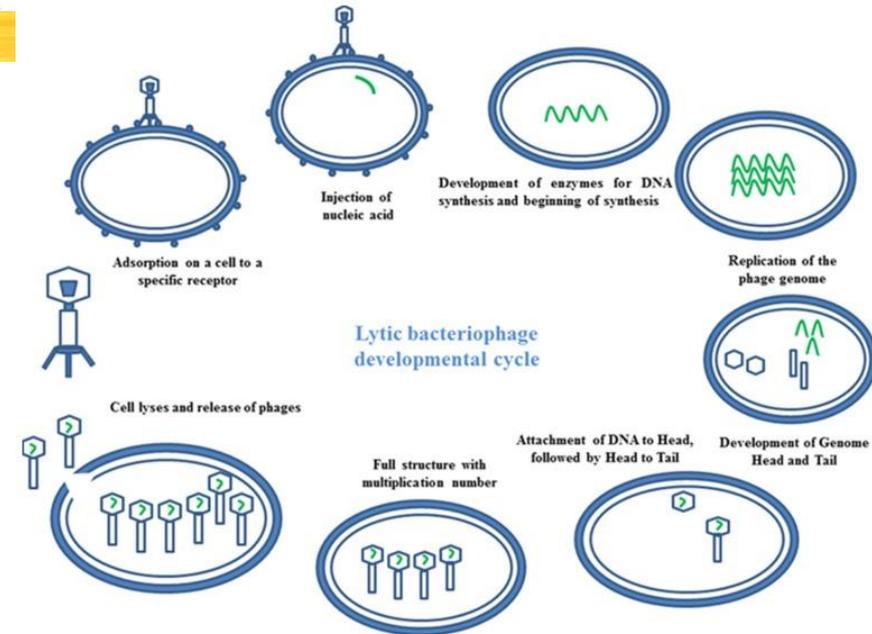
Schematic diagram of antibacterial peptides with mechanism of action

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

b) PHAGE THERAPY

- ▶ I batteriofagi sono virus dei batteri ed agiscono come patogeni degli stessi
- ▶ Essi in maniera specifica attaccano ed uccidono solo la cellula batterica alla fine del processo di infezione
- ▶ Furono usati per la prima volta nel 1917 poco dopo la loro scoperta e furono usati come preparazione orale per trattare la dissenteria bacillare
- ▶ Ebbero la loro età dell'oro negli anni '30, ma la scoperta degli antibiotici ridusse la ricerca di possibilità terapeutiche tramite essi
- ▶ I fagi possono portare sia fattori di virulenza Vs i batteri infetti sia geni per loro tossici, e mostrerebbero dei vantaggi nei confronti dei comuni antibiotici, che sono eliminati da vie metaboliche od escretive e che richiedono numerose somministrazioni
- ▶ Al momento, però, il loro uso è permesso solo in Russia ed in Georgia dove vengono utilizzati per il trattamento di infezioni avanzate dove la terapia antibiotica convenzionale è fallita
- ▶ E' stato proposto il loro uso nei cibi e nelle superfici a contatto dei cibi per prevenire infezioni mediate dai cibi infetti, ad esempio da *Listeria monocytogenes* (Fago LMP-102)



Mechanism of phage therapy.

Image represents the schematic diagram of developmental cycle of lytic bacteriophage

Borysowski et al., 2011

The example includes LMP-102(Daniells, 2006).

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

c) FITOCHIMICI

► I fitochimici sono molto presenti in natura sono metaboliti secondari trovati nelle piante. In molti casi funzionano come meccanismi di difesa delle piante nei confronti dei microrganismi, insetti ed erbivori

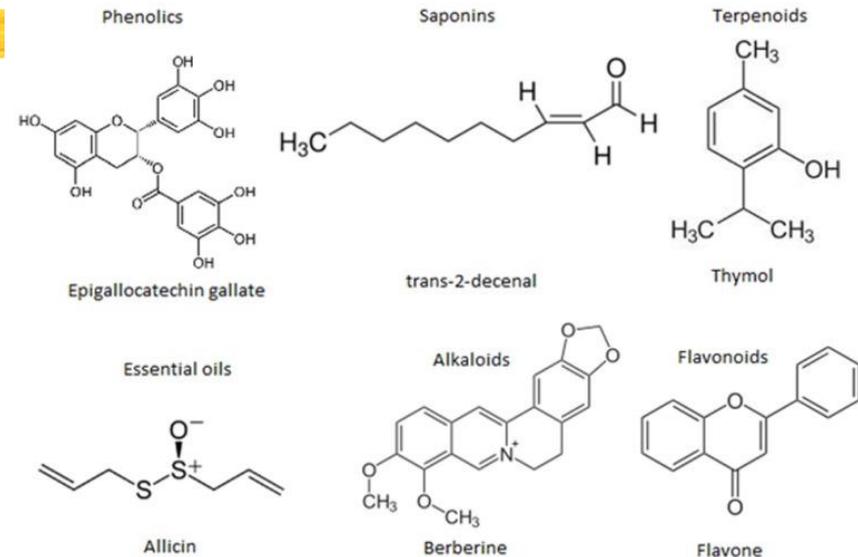
► Al momento circa un migliaio di fitochimici sono contemplati come antimicrobici

► Gruppi di fitochimici:

- Fenolici
- Terpenoidi
- Oli essenziali
- Alcaloidi
- Flavonoidi
- Peptidi

► Strategie che contemplano l'uso di fitochimici associati ad antibiotici sono state studiate recentemente (Sakharkaret al., 2009; Jayaraman et al., 2013)

► Un recente studio rivela che un fitochimico abbinato ad un antibiotico presenta un'inibizione multi-target nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa* GyrB/ParE e DHFR (Jayaraman et al., 2010).



Representative chemical structures of some antimicrobial phytochemicals.

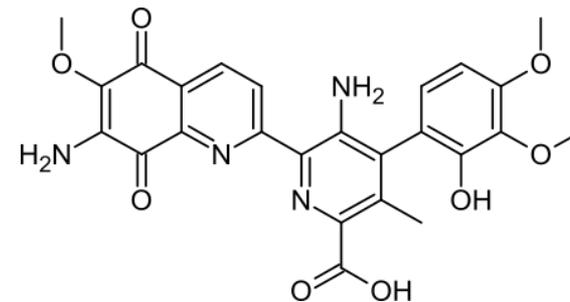
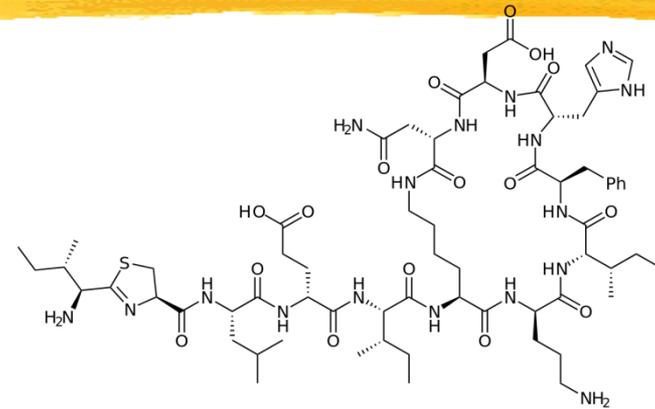
Phytochemicals like phenolics, saponins, essential oils, terpenoids, alkaloids, and flavonoids are the major classes showed antibacterial activity

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

d) METALLO-ANTIBIOTICI

- L'incorporazione di metallo-ioni in composti antimicrobici sembra essere promettente come terapia alternativa
- I metallo-ioni incorporati in metallo-antibiotici sarebbero coinvolti nell'interazione con le membrane, le proteine, gli acidi nucleici e numerose altre biomolecole
- In alcuni casi i metallo-ioni sono già incorporati all'antibiotico regolandone le funzioni come nella Bleomicina, Bacitracina, Streptonigrina e Albomicina
- In alcuni casi sono attaccati alla molecola antibiotica senza causare un cambiamento importante nella molecola
- Le Tetracicine, gli acidi orolici ed i chinoloni sono frequentemente usati in queste strategie (Chohan et al., 2005).

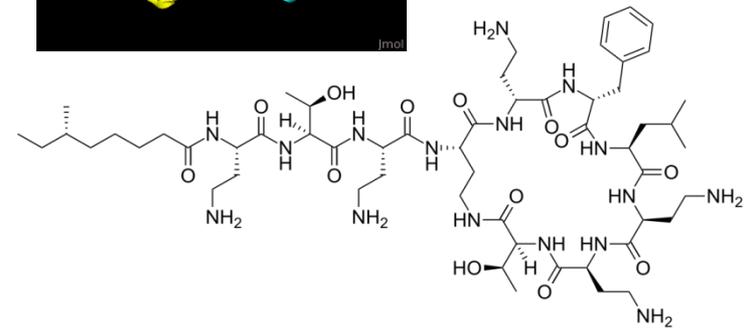
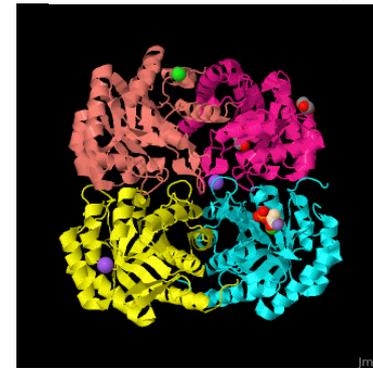
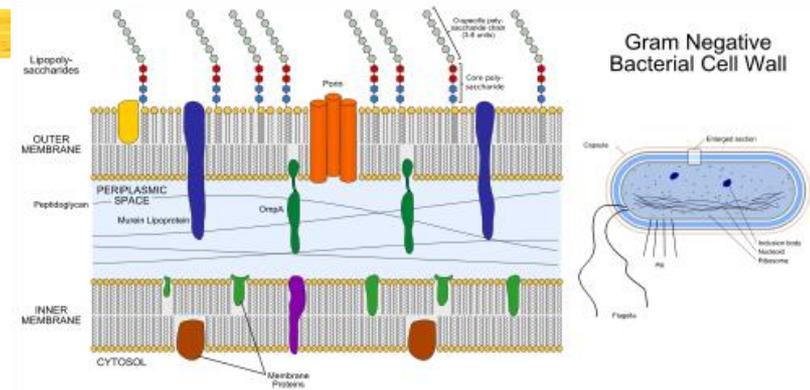


Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

d) INIBITORI DEL LIPOPOLISACCARIDE

- ▶ L'LPS rappresenta una **barriera protettiva importante** per i **Gram** – proteggendo i batteri dall'ingresso di alcuni **antibiotici** e dia alcune **sostanze tossiche**
- ▶ Gli **inibitori di LPS** solitamente agiscono **inibendo la KDO8-psynthase**, un importante enzima del *pathway* dell'LPS
- ▶ Vi sono stati dei **report** riguardanti alcuni **inibitori** come la **PD404182** e la **polymyxin B (PMB)**, che sono composti che sono stati **applicati con la terapia antibiotica**, permettendo all'antibiotico di **passare la membrana batterica**
- ▶ Alcuni batteri poi, riescono a **controllare lo sviluppo del LPS di Salmonella** (azione osservata in alcuni ceppi di **lattobacilli**) (Yeung et al.,2013).



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

e) INIBITORI DELLA POMPA D'EFFLUSSO

► Le pompe vengono utilizzate dai batteri per “pompare” al loro esterno le molecole antibiotiche tramite dei *transporters*. Questo processo non è specifico ed alcuni *transporters* sono conosciuti come pompe “multi drug resistance” In relazione alla loro struttura e funzione le pompe d'efflusso sono divise in 5 classi

- SMR pumps of the drug/metabolite transporters (DMTs) superfamily,

-ABC,

-RND,

-MFS,

-M(ATE transporters of the multi-drug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide flippases (MOP) superfamily)

► Gli inibitori di pompa d'efflusso potrebbero essere combinati con gli antibiotici commercializzati (Marquez,2005; Delmar et al.,2014).

► Il loro maggior vantaggio è quello di rallentare lo sviluppo di resistenze dai batteri target

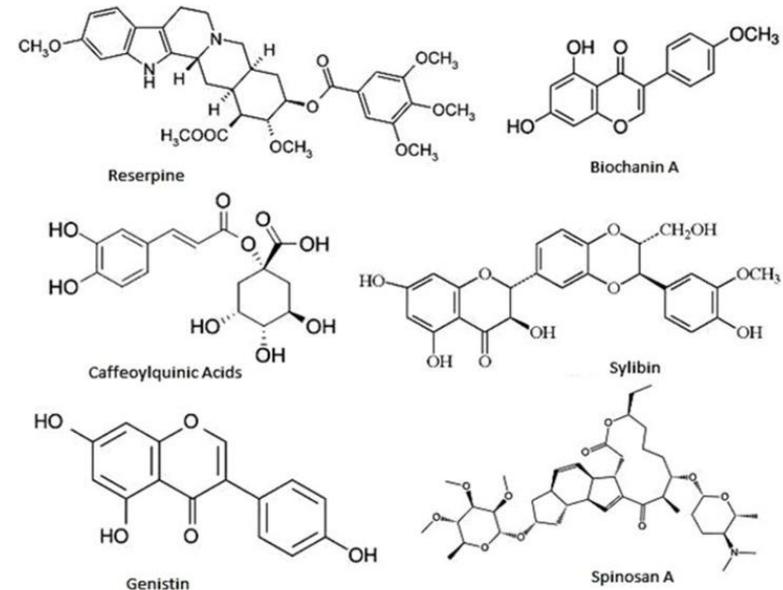
► Sono descritti anche numerosi svantaggi quali:

-La loro sintesi chimica dovuta alla loro ingombrante struttura

-Problemi di solubilità e di permeabilità

-Richiesta di alte concentrazioni

(Bremner, 2007).



Few representative chemical structures of efflux pump inhibitors

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Nuove strategie

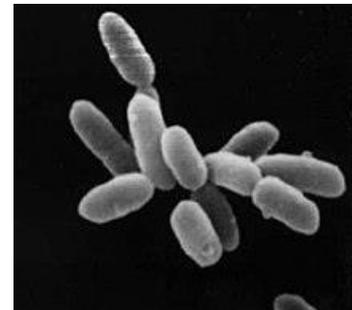
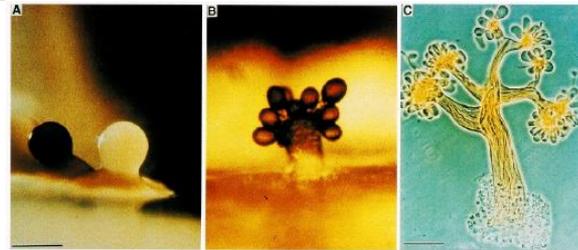
MIXOPIRONINE E ARCHEOCINE

► **Mixopironinisan alfa- pyrone**, antibiotico prodotto da *Myxococcus fulvus* garantisce un'attività **antimicrobica** nei confronti **molti Gram+** e d **alcuni Gram -** [*E. coli* D21f2tolC(rfatolC), *Moraxella catarrhalis* ATCC25238].

► Anche i batteri *Archaea* contengono potente **antimicrobici** conosciuti come **archeocine**

► **Altre sostanze: halocine e sulfolobicine**

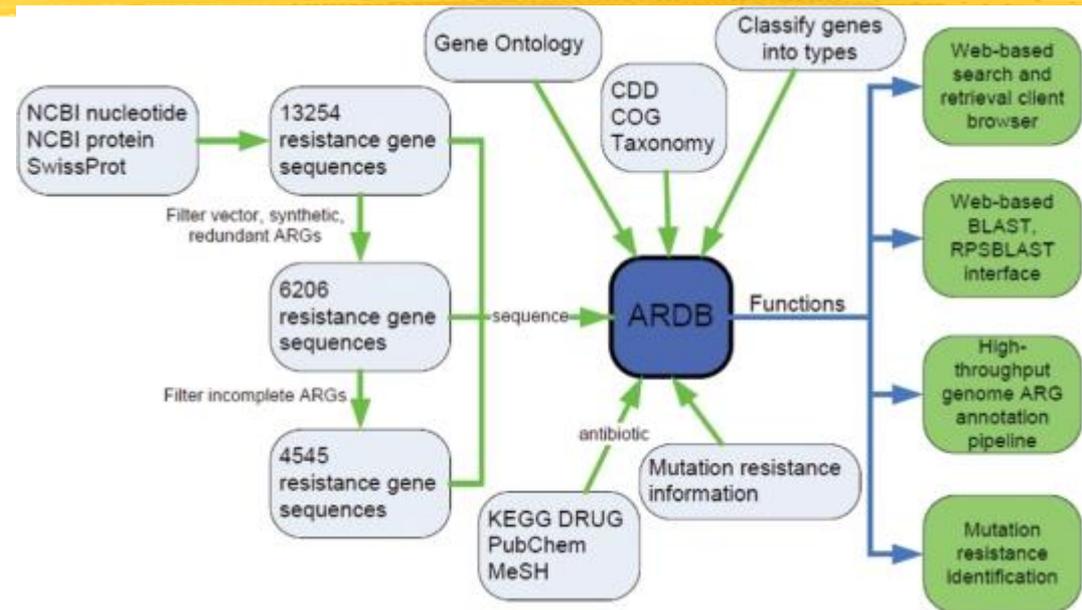
► **Alcune modificazioni sintetiche** potrebbero condurre allo **sviluppo di alcune molecole antibiotiche a partenza da queste sostanze**



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Considerazioni conclusive

- ▶ Medical pundits are now warning of a return to the preantibiotic era; a recent database lists the existence of more than **20,000 potential resistance genes** (r genes) of nearly **400 different types**, predicted in the main from available bacterial genome sequences
- ▶ **Fortunately**, the number existing as functional resistance determinants **in pathogens is much smaller**
- ▶ To address the limitations of currently available public resources, and to **facilitate the identification and characterization of antibiotic resistance genes**, we have created a **manually curated database [Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB)]** unifying most of the publicly available genes and related information.
- ▶ Our **motivations in creating ARDB** are
 - (i) to provide a **centralized compendium** of information on antibiotic resistance;
 - (ii) **to facilitate** the consistent annotation of resistance **information in newly sequenced organisms**;
 - (iii) and (iii) to facilitate **the identification and characterization of new genes**. We believe this resource will be found useful by a **broad range of scientists, including microbiologists, clinicians and the bio-defense research community**



Nucleic Acids Res 2009 Jan;
37(Database issue): D443–
D447.

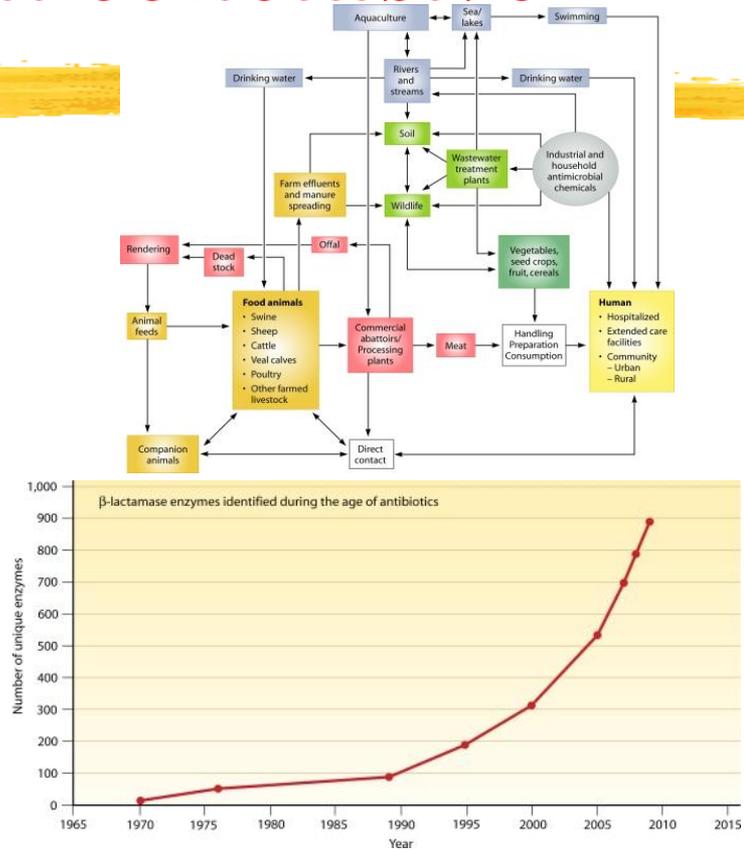
Published online 2008 Oct 2.
doi: 10.1093/nar/gkn656
PMCID: PMC2686595
PMID: 18832362

**ARDB—Antibiotic
Resistance Genes Database**
Bo Liu¹ and Mihai Pop¹

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Considerazioni conclusive

- ▶ Unfortunately, the colossal need for these valuable drugs has had a significant environmental downside.
- ▶ In the 60 years since their introduction, millions of metric tons of antibiotics have been produced and employed for a wide variety of purposes. Improvements in production have provided increasingly less expensive compounds that encourage non prescription and off-label uses.
- ▶ The cost of the oldest and most frequently used antibiotics is (probably) mainly in the packaging.
- ▶ The planet is saturated with these toxic agents, which has of course contributed significantly to the selection of resistant strains.
- ▶ The development of generations of antibiotic-resistant microbes and their distribution in microbial populations throughout the biosphere are the results of many years of unremitting selection pressure from human applications of antibiotics, via underuse, overuse, and misuse.
- ▶ This is not a natural process, but a man-made situation superimposed on nature; there is perhaps no better example of the Darwinian notions of selection and survival.



MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Sept. 2010, p. 417-433
1092-2172/10/\$12.00 doi:10.1128/MMBR.00016-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Vol. 74, No. 3

Origins and Evolution of Antibiotic Resistance
Julian Davies* and Dorothy Davies
Department of Microbiology and Immunology, Life Sciences Institute, University of British Columbia,
2350 Health Sciences Mall, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada

Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Considerazioni conclusive

- ▶ Le cause del declino dello sviluppo di nuove molecole antibiotiche
- ▶ Ultimi 50 anni: sviluppate solo due classi di antibiotici sintetici:
 - a) Fluorochinoloni (a largo spettro d'azione)
 - b) Oxazolidoni
- ▶ Ultimi 40 anni: solo tre composti di origine naturale introdotti:
 - a) Daptomicina
 - b) Quinupristin-Dalfopristin
 - c) Fidaxomicina
- ▶ Dal 2004: introduzione di sole cinque molecole antibatteriche
- ▶ Ciò è stato dovuto soprattutto a cause di origine economica:
 - 1) La terapia antibiotica si effettua solo per un periodo limitato di tempo (se confrontata con la terapia per le patologie cronico-degenerative, dismetaboliche e psichiatriche)
 - 2) Gli antibiotici garantiscono un ritorno di investimenti limitato se comparato ad esempio agli antri-retrovirali
 - 3) Lo stop nella ricerca di nuove molecole antibiotiche a largo spettro mentre si cerca di ridurre l'uso a vantaggio di altre strategie
- ▶ Di contro i dati riguardanti l'aumento di ceppi antibiotico-resistenti e di MDRO è impressionante

Improper use of antibiotics

Late administration in critically sick patients

Broad-spectrum antibiotics used too often or narrow-spectrum antibiotics used incorrectly

Antibiotics doses lower or higher compared to the ones suitable for specific patients

Antibiotic treatment duration too short or too long

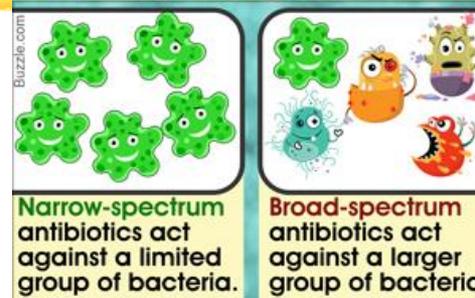
Antibiotic treatment optimized depending on the results of microbiological culture



Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

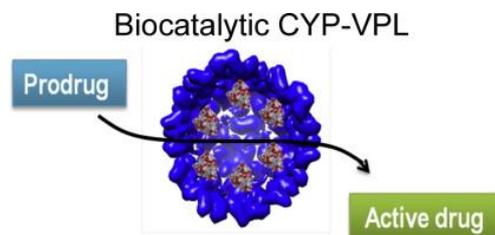
Considerazioni conclusive

- ▶ Ricerca di antibiotici specie-specifici, dotati di scarsa tossicità diretti contro specifici target batterici e che non danneggino la normale flora batterica
- ▶ Questi antibiotici a spettro ristretto darebbero anche meno problemi di antibiotico-resistenza
- ▶ Ricerca di nuove classi di antibiotici per lo sviluppo di piattaforme per l'uso di terapia di combinazione
- ▶ Ricerca di antibiotici-multi-target
- ▶ Sviluppo di antibiotici che agiscono *pro-drug* attivati da specifici enzimi batterici come l'azione sviluppata da alcuni antibiotici ad azione *like pro-drug* quali, l'isoniazide, la pirazinamide, l'etonamide, il metronidazolo



Questions for further research

- Awaken the public to the suitable use of antimicrobials
- Strengthen prevention and control of nosocomial infections
- Reconsider end points for marketing authorization of new antibiotics
- Prepare follow-up reports
- Strengthen and coordinate research activities and clinical trials
- Tax incentives for industries and an establishment of public-private partnerships
- Train doctors on good practices



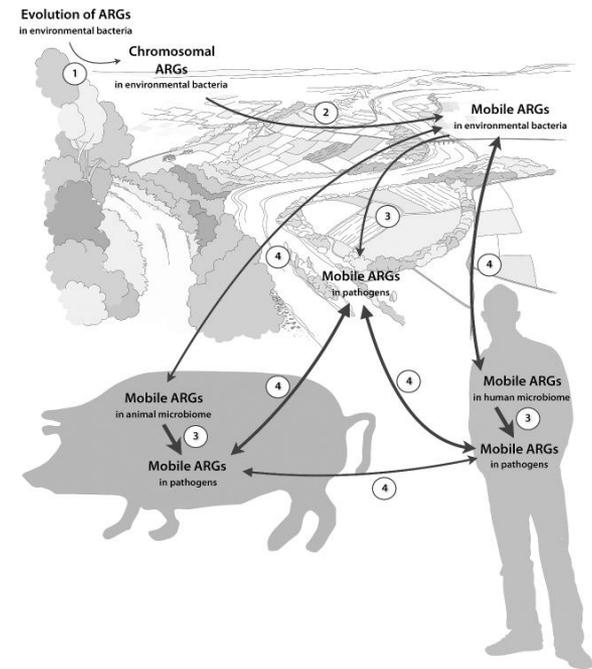
Prospettiva futura della resistenza ai farmaci antibatterici

Considerazioni conclusive

- ▶ **Collect National Data su Antibiotics e Resistance**
 - USA in ritardo rispetto ad EU
- ▶ **Stop dell'abuso degli antibiotici in agricoltura**
 - Esempio della Danimarca: stop all'uso degli antibiotici circa 20 anni orsono con incremento della produzione di numerose volte
- ▶ **Stop dell'abuso degli antibiotici negli animali**
- ▶ **Modernizzare gli approcci alla prevenzione delle infezioni**
- ▶ **Ricerca di nuovi trattamenti che non richiedano l'uccisione dei microbi**
 - **disarmare i patogeni con:**
 - a) **inibizione della sintesi di endotossine,**
 - b) **privare i microbi dei nutrienti (ad esempio il Ferro),**
 - c) **modulare la risposta dell'ospite ai patogeni senza attaccare il target microbico proteggendo il microbiota con probiotici**
- ▶ **Sviluppo di un piano internazionale per combattere l'antibiotico-resistenza**
 - **cooperazione tra agenzie governative, università, medici, industria**
- ▶ **Ciò sottolinea il fatto che la veloce ricerca di geni di resistenza mediante sorveglianza globale e locale ed il pronto contenimento dei patogeni che portano i tali geni rappresenta un fondamentale sistema di controllo**
- ▶ **Sarà importante per il futuro la valutazione del rilascio di un antibiotico nell'ambiente senza prima avere programmato uno studio del relativo impatto ambientale**

UOMINI, ANIMALI E ANTIBIOTICI:
UN TRIANGOLO "PERICOLOSO"

GIOVEDÌ 9 MARZO 2017



Grazie dell'attenzione!

