

# MECCANISMI DI ACQUISIZIONE DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA.

## *MECHANISMS FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE.*

ANNA ZAGHINI

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale  
Facoltà di Medicina Veterinaria – Alma Mater Studiorum-Università di Bologna.*

**Parole chiave:** antibatterici, antibiotico resistenza, acquisizione, trasmissione, costo della resistenza.

**Key words:** antibacterials, antibiotic resistance, mechanisms, fitness cost.

**Riassunto.** Gli antibatterici vengono utilizzati, sia in campo umano che in quello veterinario, da più di 60 anni ed in questi anni una elevata pressione selettiva è stata esercitata sugli ecosistemi batterici caratteristici sia dell'uomo che degli animali, portando alla comparsa della resistenza, un evento tanto "atteso" quanto "imprevedibile".

La resistenza agli antibatterici può essere *intrinseca* (naturale) oppure *acquisita*; la prima è solitamente determinata dalla mancanza del "bersaglio" cellulare attraverso cui l'antibatterico esercita la propria azione, oppure da una impermeabilità di membrana all'antibatterico stesso. La seconda invece origina da mutazioni cromosomiche, oppure dall'acquisizione di materiale genetico "trasferibile" e già presente nella popolazione batterica, indipendentemente dal fatto che questo materiale genetico sia correlato o meno alla stessa popolazione batterica che lo riceve, quindi la "scambio" può avvenire tra batteri patogeni e batteri commensali sia dell'uomo che degli animali. In ogni caso la resistenza batterica ha sempre una origine genetica.

La resistenza cromosomica si sviluppa a seguito di mutazioni nelle sequenze nucleotidiche del cromosoma batterico risultando nella sintesi di proteine o di macromolecole che differiscono da quelle originali del batterio e tali da interferire con l'attività dell'antibatterico. Come in tutte le popolazioni cellulari, le mutazioni sono degli eventi assolutamente spontanei che, solitamente, vengono "perse" o "riparate" dalla cellula stessa. Naturalmente le mutazioni che comportano l'acquisizione della resistenza si rivelano utili al batterio solo quando quest'ultimo venga a contatto con antibatterici.

Nel caso della resistenza per "trasferimento" di materiale genetico, va sottolineato come i batteri siano caratterizzati da sistemi di trasferimento di questo materiale che sono estremamente efficienti e che sono in grado di scambiare e/o di accumulare geni della resistenza. I veicoli più importanti per il trasferimento di geni della resistenza sono i plasmidi, i trasposoni e gli integroni. I principali meccanismi che i batteri utilizzano per il trasferimento della resistenza sono rappresentati da: coniugazione (plasmidi), trasduzione (batteriofagi) e trasformazione (trasferimento diretto di DNA).

Le principali "strategie" di resistenza utilizzate dai batteri sono rappresentate da: *modificazione della permeabilità*: intesa come impermeabilizzazione all'antibatterico, ma anche come capacità di espellere attivamente l'antibatterico entrato nella cellula; *modificazione dell'antibatterico*: a seguito della produzione, da parte del batterio, di enzimi in grado di modificare la molecola di farmaco inattivandola; *modificazione del*

*bersaglio* dell'antibatterico (ad esempio un enzima, oppure una subunità ribosomiale). Relativamente alla persistenza della resistenza agli antibatterici, va sottolineato come questo fenomeno possa essere anche molto rapido nel comparire, ma molto lento nello scomparire. Inoltre, quando un batterio sia "multiresistente", con i determinanti della resistenza geneticamente legati, la resistenza perdurerà finché il batterio sia esposto ad antibatterici ai quali i diversi determinanti siano geneticamente legati (co-selezione).

**Abstract.** Antibiotics have been used for more 60 years. During this period an important selection pressure has been exerted on bacterial eco-systems in humans and animals and has led to the emergence of resistant bacteria. The development of bacterial resistance has been an expected but rather an unpredictable phenomenon.

Bacterial resistance to antibiotics may be intrinsic (natural) or acquired. Intrinsic resistance (non-susceptibility) is a characteristic of bacterial species that are homogeneously resistant to a particular antibiotic. Either because they lack the cellular mechanisms by which that particular antibiotic exerts its action or because the bacterial wall is impermeable to the antibiotic. Acquired resistance can originate from chromosomal mutation or from the acquisition of transferable genetic material already present within or unrelated bacterial populations. It can be found in every pathogenic bacterial species as well as in the commensal flora of man and animals, but the prevalence varies considerably between bacterial species and even between subspecies. All resistance has a genetic basis.

Chromosomal resistance develops from mutations in the nucleotide sequences of the bacterial chromosome resulting in the synthesis of proteins or other macromolecules that differ from the original chemical entities to interfere with the antibiotic activity. Mutations can occur continuously and irrespective of the presence of antibiotics, but are generally lost or repaired by cellular mechanisms. Mutations with increased antibiotic resistance are advantageous to the bacterium only when antibiotics are used. In general the number of the resistant mutants will decrease after cessation of exposure. Transferable resistance can occur by means the "movement" of genetic materials. Bacteria have extremely efficient genetic transfer systems capable of exchanging and accumulating resistance genes. Certain bacterial genes, including genes encoding for resistance, can move between chromosomal and extra-chromosomal DNA elements in bacteria. The most important vehicles for transfer of resistance genes in bacteria are plasmids, transposons and integrons. The mechanisms for inter-bacterial transfer of resistance are conjugation (transmission by plasmids), transduction (transmission by bacteriophages) and transformation (direct transfer of free DNA originating, for example, from lysed bacteria).

The most common resistance mechanisms is antibiotic inactivation, but bacteria utilize four main resistance strategies. Modification of their permeability: bacteria modify their permeability either by becoming impermeable to antibiotics or by actively excreting the antibiotic accumulated in the cell. Modification of antibiotic: bacteria produce enzymes capable of modifying and directly inactivating antibiotics. Modification of target: bacteria modify the structure of the antibiotic's target molecule. Overproduction of the target.

Although antibiotics achieve selection for a new type of resistance quite rapidly, removal of antibiotic stopping reverses this trend only slowly. Furthermore, in cases where a

bacterium is multiresistant with genetically linked resistance determinants, resistance will remain present as long as other antibiotics are used to which the determinant is genetically linked (co-selection).

**Introduzione.** Per antibiotico-resistenza si intende la capacità di un microrganismo di mantenere le funzioni vitali in presenza di un farmaco letale per il ceppo originario. La resistenza batterica è un fenomeno naturale: la popolazione batterica difende se stessa dalla minaccia dell'antibatterico con meccanismi spontanei.

Nel 1940, quando la penicillina iniziò a essere impiegata in clinica, tutti i ceppi di *S. aureus* erano sensibili, ma già nel 1947 il 66% e, nel 1951, il 75% dei ceppi isolati da pazienti del Boston City Hospital risultavano resistenti alle penicilline (Finland, 1979). Dalla scoperta della penicillina, molti antibiotici sono stati scoperti oviando, almeno all'inizio, al problema, oggi ormai emergenza, dell'antibiotico resistenza. Gli antibatterici sono diventati indispensabili strumenti per diminuire la morbilità e la mortalità associate alle malattie infettive sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria (Johnston, 1998). L'insorgenza di resistenza e, in parte la sua diffusione, sono insite della genetica batterica quindi, di fatto, sono inevitabili una volta utilizzato un dato antibiotico. Si può affermare che la principale causa dell'aumento, su scala mondiale, della resistenza sia rappresentata dalla pressione selettiva (quanto e per quanto tempo un dato antibiotico viene utilizzato) esercitata dall'uso di antibatterici.

*Levy et al.* (1976) dimostrarono in polli, ai quali erano state somministrate tetraciclina, la trasmissione di geni tetraciclino-resistenti tra ceppi di *E. coli* di un pollo, da pollo a pollo e dal pollo all'uomo. Nel 1982, la streptotricina fu introdotta come promotore di crescita nel suino. Questo antibiotico non era mai stato utilizzato in Medicina Umana e non dimostrava cross-resistenza con altri antibiotici. Un anno dopo la sua introduzione fu riscontrata la resistenza alla nourseptricina in *E. coli* fecali degli stessi suini. I geni della resistenza erano localizzati sul trasposone Tn-1825 e, dopo due anni, lo stesso trasposone fu riscontrato non solo nei batteri isolati dalle feci degli allevatori e dei loro familiari, ma anche negli abitanti delle case vicine, come pure in *E. coli* isolati da infezioni del tratto urinario in persone che non avevano avuto contatti con la fattoria, ma che vivevano nelle vicinanze. Successivamente i medesimi geni furono ritrovati anche in batteri patogeni; non solo nei batteri zoonotici, come *Salmonella spp.*, ma anche *Shigella spp.*, un batterio che colpisce solo l'uomo e non gli animali (Hummel *et al.*, 1986).

**Meccanismi di base della resistenza.** Va distinta la resistenza intrinseca da quella acquisita.

I batteri possono essere naturalmente resistenti ad alcuni antibiotici, ad esempio a causa dell'impossibilità di raggiungere il sito di azione (assenza delle strutture bersaglio o impermeabilità) o di agire (presenza di enzimi inattivanti). Per questo tipo di resistenza si configura solo un TRASFERIMENTO VERTICALE.

Diversamente, nell'antibiotico resistenza acquisita i batteri inizialmente sensibili subiscono una modificazione ereditaria (mutazione cromosomica), oppure "acquisiscono" materiale genetico contenente l'"informazione resistenza" (trasferimento genico) che riduce la loro sensibilità o li rende insensibili ad un dato farmaco. Per la resistenza acquisita si parla invece di un TRASFERIMENTO ORIZZONTALE.

**Mutazione cromosomica.** Il DNA della cellula sensibile può subire una mutazio-

ne in seguito alla quale una proteina che viene normalmente prodotta dalla cellula viene alterata nella sua capacità di interagire con il farmaco o di svolgere la funzione necessaria al suo effetto. Questa mutazione è un processo naturale e spontaneo che la cellula batterica subisce indipendentemente dal farmaco ma che, in seguito ad un eventuale “contatto”, consente di sopravvivere e di dare vita ad una popolazione farmaco resistente completamente nuova. L'unico ruolo svolto dall'antimicrobico è quello di fornire una forte pressione di selezione a favore delle cellule mutate-resistenti ed impedire invece la crescita delle cellule sensibili. Quindi la maggior parte della popolazione iniziale non diviene resistente, ma risponde al farmaco nel modo atteso, per poi essere sostituita dalle cellule meno sensibili (resistenti) al farmaco (Bryson e Demerc, 1955).

Nello sviluppo delle mutazioni che riguardano la resistenza di tipo cromosomico, si osservano due modelli distinti: il *modello one-step*, in cui la concentrazione minima inibente (MIC) può aumentare notevolmente con una singola mutazione (tipico della streptomina, una sola mutazione fa variare la sensibilità di 1000 volte) ed il *modello multi-step*, in cui l'evento risulta essere più graduale, tipico invece della penicillina. In quest'ultimo è necessario che la cellula batterica, per sviluppare resistenza, sia esposta ripetutamente a concentrazioni crescenti del farmaco poichè il meccanismo richiede una serie di mutazioni conseguenti.

Trasferimento genico (extra-cromosomica). Sebbene i batteri possano sviluppare resistenza attraverso il processo di mutazione e selezione, nella maggior parte dei casi la farmaco resistenza incontrata in clinica tra i batteri patogeni è dovuta al trasferimento dei geni per la resistenza da un ceppo batterico ad un altro. Inoltre, frequentemente, numerosi geni vengono trasferiti contemporaneamente alla popolazione sensibile al farmaco, determinando resistenza a parecchi antibiotici con meccanismi di azione completamente diversi (multi resistenza). Quindi il trattamento con uno qualsiasi di questi farmaci seleziona ceppi resistenti non solo a quel farmaco, ma ad altri farmaci a cui la popolazione batterica non è mai stata esposta. Questo metodo di acquisizione della farmaco resistenza è nota come “farmacoresistenza multipla infettiva e trasmissibile” (Falcow, 1975). Quest'ultima non può essere giustificata sulla base del meccanismo di mutazione e selezione, perché la probabilità che un singolo ceppo subisca una mutazione tale da renderlo resistente a tutti e tre gli antibatterici è estremamente bassa.

I geni per la farmaco resistenza trasmissibile sono localizzati su pezzetti circolari di DNA extracromosomico denominati “plasmidi”. Infatti i batteri hanno una notevole capacità di condividere informazioni che permettono loro di sopravvivere in condizioni ambientali avverse: l'assenza di una membrana nucleare consente ai geni di muoversi facilmente dai cromosomi verso gli altri elementi genetici e da questi verso altri batteri.

PLASMIDI. I plasmidi sono elementi liberi e circolari di DNA (da 1 a 500 geni; da 2 kpb a > 100 kpb) extra cromosomico dotati di capacità replicativa, sono fondamentali nell'evoluzione dei batteri in quanto influiscono sulla replicazione, sul metabolismo, sulla fertilità come pure sulla resistenza alle tossine batteriche, agli antibiotici ed ai batteriofagi; assicurano quindi, una maggiore probabilità di sopravvivenza e di propagazione. I plasmidi possono *in toto* o in parte integrarsi con altri plasmidi o con il

DNA cromosomiale.

I plasmidi per la farmaco resistenza sono stati classificati in plasmidi R, quando sono auto-trasmissibili per la coniugazione (plasmidi coniugativi), e in plasmidi r quando non sono auto-trasmissibili (plasmide non coniugativo). Questi ultimi sono più piccoli proprio perché non contengono i geni per il trasferimento coniugativo; si trovano in molti batteri, ma sono particolarmente importanti per gli stafilococchi e per i Gram+, per i quali sono responsabili della maggioranza o di tutte le farmaco resistenze mediate da plasmidi. Di solito, i plasmidi r codificano la resistenza ad un singolo antibiotico e, solo raramente, la resistenza a due antibiotici. Campioni clinici di stafilococchi possono risultare resistenti a più antibiotici perché contengono parecchi plasmidi r, ciascuno dei quali esiste nella cellula in molte copie (Pratt e Taylor, 1998).

**TRASPOSONI.** Per diversi anni, non è stato chiaro come specifici geni per la farmaco resistenza si possano essere diffusi così rapidamente. Sebbene plasmidi e batteriofagi siano validi vettori per il trasferimento della resistenza, la sola loro esistenza non poteva spiegare perché generi diversi potessero aver acquisito praticamente lo stesso gene per la resistenza ad uno specifico farmaco. Tutto questo fu spiegato con l'esistenza di elementi genetici trasponibili: i trasposoni (hanno dimensioni variabili: da 1kpb a 60 kpb). Essi sono elementi mobili di DNA che hanno la capacità di integrarsi in numerose sequenze di DNA non omologhe, di "saltare" da un plasmide ad un altro, da un plasmide ad un cromosoma batterico e viceversa, con un meccanismo che non richiede le funzioni di ricombinazione del batterio (Kleckner, 1981). Si possono quindi ritrovare trasposoni identici nel genoma, o nei plasmidi, di organismi diversi.

La capacità di trasportare geni della farmaco resistenza da un sito all'altro dipende, in parte, dalla presenza di sequenze di inserzione IS. La più semplice forma di trasposone contiene una sequenza di inserzione IS contenente solo i geni deputati alla trasposizione; la forma più complessa invece presenta una regione centrale, con geni "passeggeri" che codificano per informazioni diverse dalla trasposizione (ad esempio per l'antibiotico resistenza), affiancata in entrambi i lati da sequenze di inserzione (Saylers e Amiable-Cuevas, 1997). Il DNA plasmidico può essere introdotto nel cromosoma batterico dove il plasmide non può replicarsi ma, se il plasmide contiene un trasposone per la farmaco resistenza, i geni della farmaco resistenza possono essere liberati per mezzo della trasposizione nel cromosoma batterico o in un plasmide residente. Il DNA trasposto può replicarsi anche se il plasmide donatore della farmaco resistenza è andato perduto. Quindi la trasposizione permette la diffusione dei geni per la farmaco resistenza ad una varietà di batteri ancora più ampia di quanto, da soli, possano fare i vettori plasmidici.

**INTEGRONI (cassette di resistenza).** Sono piccoli elementi genetici mobili (1 solo gene, < 2 kpb) privi di sistemi di replicazione e di trasposizione; il gene di cui sono costituiti è solitamente un gene di resistenza. Gli integroni sono spesso presenti nei plasmidi, con una specifica struttura costituita da due regioni fisse ed una regione centrale in cui possono essere contenuti i "gene cassettes" per l'antibiotico resistenza. I gene cassettes sono elementi che contengono un singolo gene ed un sito ricombinante. Molteplici "gene cassettes" possono essere disposti in tandem, e più di 60 diversi cassettes sono stati identificati fino ad oggi per la resistenza a aminoglicosidi, betalattamici, cloramfenicolo, streptomina e trimetoprim (Hall, 1999).

**Trasferimento della resistenza.** Esistono tre meccanismi con cui i geni della resistenza possono essere trasferiti da un batterio ad un altro: TRASFORMAZIONE, TRASDUZIONE e CONIUGAZIONE.

**TRASFORMAZIONE.** Piccole porzioni di DNA contenenti i geni della farmaco resistenza vengono captati dall'ambiente da un batterio ancora sensibile per essere incorporati nel cromosoma di quest'ultimo. Infatti la morte di una cellula non comporta necessariamente la distruzione del materiale genetico: quando i batteri si lisano spesso rilasciano il loro DNA nel mezzo circostante. Questo DNA mantiene la sua capacità di dirigere la sintesi di proteine specifiche nel caso penetri in un'altra cellula vivente. Questa cellula ricevente adsorbe sulla sua superficie, le porzioni di DNA rilasciato, che viene poi trasportato attraverso la membrana cellulare nel citoplasma, quindi incorporato mediante ricombinazione nel suo cromosoma. Di conseguenza questa cellula ricevente acquisirà nuovi caratteri, tra cui anche la resistenza. La trasformazione può rappresentare un importante meccanismo naturale di trasferimento di materiale genetico tra i batteri; in animali infetti alcuni ceppi batterici possono trasformare i microrganismi della flora normale in patogeni pericolosi (Poli e Cocilovo, 1996). Solitamente la trasformazione avviene tra batteri strettamente correlati quindi caratterizzati da una stretta omologia tra le sequenze nucleotidiche. La trasformazione è un fenomeno di frequente riscontro in natura, tuttavia ha una scarsa rilevanza clinica (Pratt e Taylor, 1998).

**TRASDUZIONE.** Questo tipo di trasferimento, quando trasmette la resistenza, ha una notevole importanza clinica, specialmente per i batteri Gram+. La maggior parte degli stafilococchi resistenti alla penicillina, per esempio, ha acquisito i geni per le beta-lattamasi attraverso questo meccanismo (Lacey, 1975).

In questo caso il trasferimento genetico è mediato dai *batteriofagi*. Un batteriofago è un virus capace di infettare e lisare determinati batteri: dopo la penetrazione nel batterio, il fago sfrutta l'apparato biosintetico della cellula ospite per replicarsi a seguito della lisi della cellula stessa, la progenie viene quindi liberata (ciclo litico). Più precisamente, quando un fago infetta un batterio, il cromosoma della cellula ospite si frammenta, durante la replicazione del fago, uno di questi frammenti può essere accidentalmente impacchettato col DNA fagico nel capsido di un virione. Se questo, dopo essere stato rilasciato, infetta un'altra cellula microbica, vi trasferisce anche i geni prelevati dal batterio infettato in precedenza; poiché il fago può includere, quindi, trasferire, qualunque regione del cromosoma batterico, si parla di trasduzione generalizzata; generalmente sono coinvolti batteri della stessa specie (Poli e Cocilovo, 1996).

**CONIUGAZIONE.** Mediante questo meccanismo i geni per la farmaco resistenza contenuti in un plasmide vengono passati da una cellula all'altra attraverso una connessione diretta tra le due cellule formata da un pilo sessuale (*sex pilus*), la cui produzione è codificata da plasmidi di coniugazione. Il donatore conserva una copia del plasmide, il ricevente può così diventare a sua volta un potenziale donatore.

La coniugazione può avvenire tra varietà di batteri della stessa specie, tra specie dello stesso genere, o anche tra specie appartenenti a diverse famiglie (popolazioni batteriche miste: cutanea, respiratoria, digerente, genitale). Ad esempio, *Staphylococcus aureus* può scambiare materiale genetico con *Enterococcus faecalis* o *Escherichia coli* (Prescott *et al.*, 2002). Questo trasferimento avviene principalmente tra i Gram- ed è il principale meccanismo con cui viene trasmessa la resistenza tra gli enterobatteri come *Shigella*

ed *E. coli* (Pratt e Taylor, 1998). Anche tra i Gram+ è stata osservata la possibilità di passaggio di materiale genetico simile alla coniugazione, ma solo in seguito ad un contatto fisico diretto tra le cellule, senza l'intervento dei pili (Poli e Cocilovo, 1996).

**Meccanismi biochimici della resistenza.** Come conseguenza delle “modificazioni” genetiche precedentemente descritte, nel tempo, i batteri hanno sviluppato numerosi e spesso “eleganti” *strategie di resistenza*.

**ALTERAZIONE DELLA STRUTTURA CHIMICA DELL'ANTIBATTERICO.**

Poiché molti antibiotici sono prodotti da microrganismi del terreno, non sorprende che i batteri che vivono nell'ambiente di questi microrganismi sappiano produrre enzimi che inattivano gli antibiotici (Rather *et al.*, 1993). Possono venire inattivati per degradazione enzimatica (ad esempio le penicilline) o attraverso una modificazione biochimica tale da impedire loro l'interazione con il sito bersaglio (aminoglicosidi). La modificazione enzimatica indotta di solito conferisce un alto livello di resistenza: l'espressione dell'enzima TEM-1  $\beta$ -lattamasi prodotto da *E. coli*, ad esempio, incrementa la concentrazione minima inibente (MIC) dell'ampicillina da 8 a > 10,000  $\mu\text{g/ml}$ . L'*Enterococcus faecalis* produce un enzima che gli permette di resistere all'attività degli aminoglicosidi tra cui la gentamicina per la quale la MIC aumenta da 32-64 a >2.000  $\mu\text{g/ml}$  (Rice *et al.*, 2003).

**POMPE AD EFFLUSSO.** Questo meccanismo sviluppato dai batteri consiste in una pompa che rimuove una o più classi di antibiotici dall'interno della cellula, non permettendo ai farmaci di raggiungere adeguati livelli per svolgere la loro azione. Possono esserci pompe più o meno selettive. La maggior parte di esse sono localizzate nella membrana citoplasmatica ed utilizzano la forza motrice dei protoni per trasportare all'esterno gli antibiotici.

L'antibiotico passa la parete esterna della cellula tramite i pori formati dalla porina, per poi diffondere attraverso lo spazio periplasmatico fino alla membrana interna, che attraversa per mezzo della captazione attiva, probabilmente mediata da carrier, pilotato da un gradiente elettrochimico. Nella membrana interna, esiste inoltre un sistema di efflusso attivo ma più debole. Il livello intracellulare del farmaco dipende dalla velocità di entrata del farmaco attraverso la parete esterna e le successive velocità di captazione ed efflusso della membrana interna. Nei batteri sensibili al farmaco, la velocità di efflusso è relativamente lenta e nella cellula si accumulano rapidamente livelli citotossici del farmaco. Nei batteri resistenti, i sistemi di captazione e di efflusso operano normalmente ma, per mantenere bassi i livelli intracellulari del farmaco un sistema di efflusso ad alta affinità trasporta velocemente l'antibiotico fuori dalla cellula (Mc Murry *et al.*, 1980). Questo meccanismo è tipicamente sviluppato dai batteri nei confronti delle tetracicline: la proteina TET, codificata da un plasmide, lega la tetraciclina e la trasporta rapidamente verso l'esterno attraverso la membrana citoplasmatica dal citoplasma allo spazio periplasmatico.

**MODIFICA DEL TARGET.** Poiché l'interazione dell'antibiotico con il suo sito di azione è generalmente molto specifica, anche piccole modifiche di questo possono avere importanti effetti sulla efficacia del farmaco. Esistono numerosi esempi di resistenza acquisita tramite l'alterazione del target, come quella ai fluorochinoloni tramite la modifica della DNA-girasi, o alle tetracicline con meccanismi di protezione del sito ribosomiale. Il grado di resistenza acquisito tramite questo meccanismo è variabile e può dipendere dalla capacità della struttura mutata di perdere completa-

mente o mantenere almeno in parte le sue normali funzioni (Rice *et al.* 2003).

**LIMITATO ACCESSO AL SITO DI AZIONE.** Se il farmaco deve superare delle barriere prima di raggiungere il suo sito di azione, cambiamenti a carico di queste barriere possono essere un altro importante meccanismo di antibiotico resistenza. Tutti i batteri Gram- sono dotati di un involucro esterno che deve essere attraversato dal farmaco prima di raggiungere la membrana citoplasmatica. Per i farmaci idrofili questo passaggio avviene attraverso pori formati da proteine denominate porine; se queste subiscono modificazioni secondarie a mutazioni, la diffusione dell'antimicrobico può essere notevolmente diminuita. Questa resistenza avviene ad esempio per le cefalosporine (Rice *et al.*, 2003). Una riduzione della velocità di diffusione facilitata o di trasporto attivo è frequentemente responsabile della resistenza ai sulfamidici.

**Costo biologico della resistenza (fitness cost).** I batteri traggono vantaggio dall'acquisizione di geni della resistenza ad un antibatterico, quando questo è presente. Tuttavia è lecita la domanda: quando l'antibatterico è assente, i batteri risentono di un "costo" della resistenza? Se così fosse, l'unica strategia per controllare la diffusione della resistenza potrebbe essere quella di sospendere l'uso di un particolare antibatterico fino a quando i "genotipi resistenti" diminuiscono ad una bassa frequenza. Numerosi studi dimostrano infatti che, in assenza di antimicrobici, i genotipi resistenti sono caratterizzati da un minore "benessere" rispetto agli analoghi sensibili, indicando in questo modo un "costo" legato alla resistenza.

Per arrivare a sviluppare la resistenza infatti, i batteri subiscono dei cambiamenti e sono costretti a modificare in parte la loro normale fisiologia. Ma non è sempre detto che questa nuova condizione non abbia anche effetti negativi. Ad esempio per sviluppare una resistenza di tipo plasmidico devono inevitabilmente sintetizzare ulteriori aminoacidi e proteine, questo processo richiede un elevato dispendio di energia ed i nuovi prodotti sintetizzati potrebbero interferire con la fisiologia del microorganismo.

Viceversa, Blot *et al.* (1991) osservano che il gene Tn5 codificante la resistenza alla bleomicina aumenta la sopravvivenza di *E. coli* in condizioni di prolungata carenza di nutrimento, sebbene non fosse presente alcun antibatterico. Bleomicina agisce danneggiando il DNA, lo stesso danno si manifesta nelle carenze di fattori nutritivi; gli Autori ritengono quindi che il gene codificante la resistenza alla bleomicina svolga una attività di "riparazione" del DNA.

Acquisire la resistenza ha quindi un "costo" per il batterio e questa variabile potrebbe influire sulla stabilità, quindi sulla eventuale reversibilità della resistenza (Levin, 2002). Ad esempio, le mutazioni nel gene *rpoB* in *E. coli*, nel gene *fusA* in *S. typhimurium* e in *S. aureus*, come pure nel gene *rpsL* in *E. coli* diminuiscono la velocità di trascrizione, di conseguenza il tasso di crescita si riduce (Andersson, 2003). Da vari studi, tra cui quello di Johnson e Russo (2002) relativo ad *E. coli*, è emerso come la multi resistenza sia strettamente legata ad una ridotta virulenza. Tuttavia, la stretta relazione tra la resistenza ed i markers della virulenza, indipendente da effetti collegati al gruppo filogenetico, è stata osservata tra isolati MDR resistenti solo alla gentamicina.

Questo indicherebbe come i geni codificanti per la resistenza e quelli per i fattori di virulenza sono presenti sullo stesso plasmide, oppure come i fattori di virulenza vengono persi in occasione delle mutazioni che determinano la resistenza (Johnson e Russo, 2002).



Quindi, se la resistenza riduce il fitness, i ceppi resistenti potrebbero perdere una competizione nei confronti di quelli sensibili, in un contesto in cui manca la pressione degli antibiotici come, ad esempio, quando termina la terapia antibatterica. La quantità di tempo necessaria, per ridurre ad un livello basso un elevato numero di batteri resistenti, è inversamente proporzionale al costo della resistenza.

Alcuni studi dimostrano comunque, che la mutazione che conferisce resistenza può anche essere gratuita o determinare scarse conseguenze negative al batterio, come una riduzione nei livelli di crescita di un solo 1%. Esempi in questo senso sono i seguenti: mutazioni rpsL (resistenza alla streptomicina) in *M. tuberculosis*, *E. coli* e *S. typhimurium*; mutazioni katG (resistenza ad isoniazide) in *M. tuberculosis*; mutazioni gyrA e parC (resistenza ai fluorochinoloni) in *S. pneumoniae* (Sander *et al.*, 2002; Andersson, 2003).

Il batterio comunque risponde all'alto costo con mutazioni compensatorie che non influiscono sulla capacità di resistere all'antimicrobico, ma permettono al batterio di divenire più stabile; queste mutazioni compensatorie sono state osservate *in vitro*, *in vivo* ed in situazioni cliniche. Ad esempio, mutanti rpsL in *S. typhimurium* resistenti alla streptomicina possono essere "compensati" da mutazioni nelle proteine ribosomiali S4, S5 e L19. Mutanti fusA in *S. typhimurium* e *S. aureus* acido fusidico resistenti, rpoB rifampicina resistenti in *E. coli*, possono essere compensati da numerose mutazioni intrageniche (Andersson, 2003). Björkman *et al.* (1998) hanno esteso queste evidenze anche a sistemi in vivo. Essi hanno infatti dimostrato che mutanti di *S. typhimurium* resistenti a streptomicina, rifampicina ed acido nalidixico erano di fatto privi di virulenza nel topo, indicativo di un elevato costo per la resistenza. Tuttavia, analogamente a quanto avviene *in vitro*, i batteri sviluppano meccanismi di compensazione che ristabiliscono la virulenza pur mantenendo la resistenza agli antibatterici.

In questo modo le speranze che il batterio perda la capacità di resistere si abbassano notevolmente. Generalmente infatti, i meccanismi di compensazione sono più frequenti rispetto a quelli di reversione. Una volta compiute queste "mutazioni secondarie compensatorie", anche in assenza dell'antibiotico i ceppi resistenti hanno inevitabilmente il sopravvento sui ceppi sensibili (Schrag *et al.*, 1997).

## Riferimenti bibliografici

- 1) Andersson D.I. (2003) Persistence of antibiotic resistant bacteria, Current Opinion in Microbiol., 6, 452-456.
- 2) Bennet P.M. (1995) The spread of antibiotic resistance. In: Baumberg S, Young J.P.W., Wellington E.M.H., Sanders J.R. (Eds), Population Genetics in bacteria. University Press, Cambridge, 317-344.
- 3) Björkman J., Hughes D., Andersson D.I. (1998) Virulence of antibiotic resistant Salmonella typhimurium, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 3949-3953.
- 4) Blot. M., Meyer J., Arber W. (1991) Bleomycin-resistance gene derived from trasposon Tn5 confers advantage to Escherichia Coli K-12, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 9112-9116.
- 5) Bryson V., Demerc M. (1955) Bacterial resistance, Am. J. Med., 18, 723-725.
- 6) Falcow S. (1975) Infectious Multiple Drug Resistance Pion Ltd, London.
- 7) Finland M. (1979) Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975, Rev. Infect. Dis., 1, 4-22.

- 8) Hall R.M. (1999) Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. NY Academy Sci.*, 870, 68-71.
- 9) Hummel R., Tschape H., Witte W. (1986) Spread of plasmide mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry, *J. Basic Microbiol.*, 26, 461-466.
- 10) Johnston A.M. (1998) Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *Br. Med. J.*, 46, 14-20.
- 11) Johnson J.R., Russo T.A. (2002) Extraintestinal pathogenic Escherichia Coli: "The other bad Escherichia Coli", *J. Lab. Clin. Med.*, 139, 155-62.
- 12) Kleckner N. (1981) Transposable elements in prokariotes, *Ann. Rev. Genet.*, 15, 341-347.
- 13) Lacey R.W. (1975) Antibiotic resistance plasmids of Staphilococcus Aureus and their clinical importance, *Bacteriol. Rev.*, 39, 1-10.
- 14) Levin B.R. (2002) Models for the spread of resistance pathogens., *Net. J. Med.*, 60, 58-64.
- 15) Levy S.B., Fitzgerald G.B., Macone A.B. (1976) Spread of antibiotic resistance plasmids from chicken to chicken and from chicken to man, *Nature*, 260 (5546), 40-42.
- 16) Mc Murry L., Petrucci R.E., Levy S.B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia Coli, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77, 3974-3377.
- 17) Poli G., Cocilovo A. (1996) *Microbiologia e immunologia veterinaria UTET* (Ed.), 130-137.
- 18) Pratt W.B., Taylor P. (1998) *Farmacoresistenza In: Farmacologia. Meccanismi d'azione dei farmaci*, Ed. Zanichelli, Bologna.
- 19) Prescott J.F., Hanna W.J.B., Reid-Smith R. (2002) Antimicrobial drug resistance in dogs, *Can. Vet. J.*, 43, 107-116.
- 20) Rather P.N., Orosz E., Shaw K.J., Hare R., Miller G. (1993) Characterization and trscriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*, *J Bacteriol.*, 175, 6492-6498.
- 21) Rice L.B., Sahn D., Bonomo R.A. (2003) Mechanisms of Resistance to Antimicrobial agents, In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., White O., *Manual of Clinical Microbiology*.
- 22) Sander P., Springer B., Prammananan T., Sturmfels A., Kappler M., Pletschet M., Bottger E.C. (2002) Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 46, 1204-1211.
- 23) Sayers A.A., Amiable-Cuevas C.F. (1997) Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?, *Antimicrob. Ag. of Chemother.*, 42, 2321-2328.
- 24) Schrag S.J., Perrot V., Levin B.R. (1997) Adaptation to the fitness cost of antibiotic resistance in Escherichia Coli, *Proc. Royal Soc. Lond. B*, 264, 1287-1291.