

Resistenza ai farmaci

Cosa succede a livello del biofilm per quanto riguarda la resistenza ai farmaci?Può succedere che quel poco di antibiotico che riesce a penetrare nel biofilm venga inattivato da enzimi lì presenti, oppure che l'antibiotico non penetri per la presenza di una matrice esopolisaccaridica intorno al biofilm che risulta impermeabile e non permette il passaggio del farmaco, determinando così un deficit di penetrazione. Altro motivo è che il ritmo di moltiplicazione dei batteri nella massa è molto lento perché il biofilm, così come non permette il passaggio degli antibiotici, non permette neanche il passaggio dei nutrienti. Alcuni antibiotici come i beta-lattamici ed altri che agiscono sulla parete cellulare, funzionano solo quando c'è replicazione, quindi la presenza di biofilm rallentando la crescita di questi microrganismi impedisce anche l'azione degli antibiotici. All'interno della massa del biofilm è ridotta la concentrazione di ossigeno, così si determina una condizione di anaerobiosi che impedisce l'attività di alcuni antibiotici, come gli aminoglicosidi (es: la salmonella in vitro è sensibile agli aminoglicosidi che però non funzionano in vivo perché a livello intestinale la condizione di anaerobiosi li inattiva). La stessa cosa succede nel biofilm, l'aminoglicoside viene inattivato dalla bassa tensione di ossigeno. Quando l'antibiotico non riesce ad eradicare il biofilm l'infezione diventa cronica. I microrganismi implicati nell'infezione dei cateteri vascolari sono nel 60% batteri GRAM + : S. aureus, S. epidermidis, S. coagulans negativi. Da un lato abbiamo i batteri che colonizzano la cute e da questa possono migrare lungo il catetere se mancano le condizioni igieniche per esempio; poi abbiamo i batteri coagulans negativi che formano grosse quantità di biofilm così la colonizzazione è facilitata. Altro GRAM+ responsabile è l'enterococcus faecalis, per quale in Italia è diffusa la vancomicina resistenza. Il 25% delle infezioni è data da GRAM – come pseudomonas, acinetobacter, ecc; il 15% è data da miceti come candida albicans e parapsilosis.

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA CATETERI VASCOLARI

CRITERI CLINICI: ipotensione, oliguria, se vi è sepsi con i segni specifici.

CRITERI LABORATORISTICI.

Per questi ultimi procediamo in maniera diversa se è possibile il catetere o se è impiantato chirurgicamente. Nel primo caso togliamo il catetere sempre nella maniera più igienica possibile per evitare di contaminarlo, quindi si taglia il catetere e si prende la parte che era nel vaso (circa 3-4 cm). Quando non è possibile togliere il catetere si effettua una puntura transcutanea fino a raggiungere il lume del catetere posizionato nel vaso, prelevando una certa quantità di sangue. È necessario fare anche un'emocultura per capire se è esclusivamente il catetere ad essere infetto, se c'è una sepsi e se è lo stesso microrganismo ad essere responsabile dell'infezione del catetere e della sepsi. Per l'espianto del catetere bisogna disinfettare la cute circostante con una soluzione di alcool e clorexidina. Per individuare l'infezione si utilizzano due metodiche: semiquantitativa e quantitativa. La punta del catetere verrà posta su una piastra di coltura per valutare il num di colonie formate. Diciamo per definizione che l'infezione del catetere è presente allorché ci troviamo di fronte ad un numero formanti colonie (CFU) >15. In questo modo ruotando la punta del catetere sulla piastra, abbiamo trovato i batteri presenti sulla superficie esterna del catetere stesso. Questo tipo di indagine viene utilizzata quando si tratta di cateteri a breve permanenza; quando si tratta di cateteri a lungo termine si utilizza, invece, la tecnica quantitativa, che consiste nel prendere la punta del catetere e sottoporla a sonicazione in modo da ottenere i batteri interni, esterni e del biofilm, che sotto l'effetto degli ultrasuoni si sgretola e ci dà i batteri in esso contenuti. In questo caso diciamo che il catetere è infetto quando il CFU > 100 colonie.

DIAGNOSI DI SEPSI ASSOCIATA A CATETERE

-EMOCULTURA;

-PUNTURA DEL CATETERE.

In questo modo si capisce qual è il microrganismo e se è lo stesso nella punta del catetere e nel sangue del paziente:

-quando il microrganismo in causa è lo stesso;

-quando presenta la stessa sensibilità all'antibiogramma;

-se il ceppo proviene dal catetere, si effettua il DNA finger print, che è un'indagine molecolare; si preleva il materiale proteico, si sottopone ad enzimi da restrizione e poi si effettua un'elettroforesi su gel di Agarosio. Si ottengono, così, delle bande che se sono uguali su entrambi i ceppi,

significa che quello presente a livello periferico responsabile della sepsi proviene dal catetere.

E' necessario così provvedere o alla sostituzione del catetere o alla rimozione o se si tratta di cateteri impiantati ,si può effettuare il cosiddetto "blocco del catetere da antibiotici", lasciando la soluzione di farmaco nel catetere per almeno 2 giorni. È necessario, per evitare queste infezioni da catetere:

- informare sempre il personale;
- corretto posizionamento;
- conoscere l'eziologia e l'epidemiologia del reparto.

La sorveglianza sanitaria, deve essere continua;bisogna conoscere i ceppi presenti nei reparti e le resistenze, la % di procedure invasive effettuate, la frequenza di applicazione di cateteri, ecc; in modo da poter procedere, in caso di infezione, con una terapia mirata.

GASTROENTERITI

L'intestino può essere considerato un bioreattore anaerobico programmato con moltissime specie batteriche; è uno degli ecosistemi nei quali il microbiota indigeno varia a seconda dei tratti di intestino che noi consideriamo. Nello stomaco, per es. i batteri sono del tutto assenti, perché il pH acido non consente la crescita di microrganismi. Nell'intestino tenue si ha un aumento dei batteri che poi si ritrovano nella massa fecale, che possono raggiungere una quantità di 10^7 - 10^8 microrganismi /g di feci. A livello del colon i microrganismi sono numerosissimi, raggiungendo anche 10^{12} microrganismi /g di feci; nel 98-99% sono costituiti da anaerobi. I batteri che normalmente colonizzano l'intestino e costituiscono il microbiota indigeno, svolgono un ruolo molto importante nel mantenere la funzionalità nei vari tratti dell'intestino, nell'aver un'azione di barriera nei confronti della penetrazione di patogeni provenienti dall'esterno. In questo caso il microbiota autoctono svolge la sua azione antibatterica attraverso un meccanismo di interferenza batterica, cioè compete con i microrganismi allottoni per il legame con i recettori per i nutrienti presenti sulla mucosa intestinale. I batteri autoctoni, inoltre, possono produrre anche sostanze tossiche per gli allottoni e sostanze antibatteriche, le cosiddette batteriocine (sono proteine ad attività antibatterica, prodotte da ceppi presenti nell'intestino e funzionano in maniera batteriocida o batteriostatica, nei confronti di microrganismi appartenenti alla stessa o a diverse specie. Se c'è nell'intestino un ceppo di coli,quelli commensali

producono batteriocine, che possono funzionare sullo stesso ceppo o anche su ceppi di specie diversa (es. proteus).

Il microbiota indigeno stimola la maturazione del sistema immunitario intestinale; infatti alla nascita l'intestino è sterile e man mano che viene colonizzato matura anche il sistema linfoide associato, che a sua volta viene stimolato dal microbiota autoctono. Nell'intestino e nella sottomucosa vi sono cellule che fanno parte del sistema APUD. Il microbiota autoctono stimola, inoltre, la produzione da parte degli enterociti e delle cellule di Paneth (presenti nelle cripte) di peptidi intestinali ad attività antimicrobica, defensine, che fanno parte dell'immunità innata che interviene nelle prime fasi della risposta immune. Molti batteri, es. i lattobacilli sono capaci di stimolare la produzione di defensine. Batteri anaerobi, fitobatteri ed altri, rappresentano uno stimolo cronico alla produzione di peptici ad azione antibatterica. Quando si utilizzano antibiotici ad ampio spettro per os per lungo tempo, si hanno alterazioni della flora intestinale con fenomeni di dismicrobismo e diarrea. Si ha alterazione dell'equilibrio con un aumento di determinate specie, le quali diventano patogene e si comportano da batteri opportunisti. E' il caso delle enteriti da candida, da S. aureus, che non sono dovute a ceppi produttori di enterotossine o a microrganismi allotoni, ma a situazioni di dismicrobismo con diarrea. Si ricorre così all'uso di probiotici.

Le enteriti secondo OMS sono responsabili di elevata mortalità infantile. Negli anni 60 i **batteri** responsabili di queste infezioni allora conosciuti erano: salmonelle, shigelle ed enteropatogeni. Successivamente gli agenti eziologia di enteriti sono aumentati e oggi abbiamo non solo salmonella e shigella ma anche campilobacter, enterobacter, plesiomonas, E. coli, clostridium difficile (responsabile della colite da antibiotici o colite membranosa) e perfringens (responsabile di intossicazioni alimentari), yersinia, aereomonas, S. aureus, M. tuberculosis. Tra i **miceti** responsabili sono: candida, aspergillus, hystoplasma capsulatum; tra i **protozoi**: entamoeba histolytica, blastocystis hominis, criptosporidium, ecc. Tra i **virus**: rotavirus (ceppi 41-42), che fanno la parte del leone; adenovirus, coronavirus, astrovirus, ecc.

Quando parliamo di enterite ci riferiamo ad una sindrome clinica caratterizzata dalla compromissione dell'apparato digerente e dominata dal sintomo della diarrea. Nelle forme di enteriti un ruolo importante spetta all'ospite (malnutrizione, acidità gastrica), le enteriti sono più frequenti nei neonati, nei soggetti con gastrite atrofica; la peristalsi intestinale è

importante perché tende ad allontanare i microrganismi, quindi soggetti con una riduzione di questa, hanno un aumentato rischio di enteriti come i tossicodipendenti che fanno uso di oppiacei. I fattori patogeni legati ai batteri: enterolesivi, enteroinvasivi ed enterotossici. Importante è anche l'ambiente, inteso come stato socioeconomico di una popolazione, condizioni igieniche, approvvigionamento idrico, conservazione degli alimenti, contaminazione delle acque superficiali e potabili. La via di trasmissione delle enteriti è quella **oro-fecale**. L'uomo attraverso l'ingestione di cibi infetti, permette la penetrazione del microrganismo che dopo viene eliminato con le feci e di conseguenza si avrà contaminazione dell'acqua e dei cibi. Un ruolo importante nella trasmissione svolgono anche le mosche. I microrganismi, quindi, penetrati per via orale superano la barriera gastrica e raggiungono l'intestino dove si moltiplicano. Abbiamo la possibilità di distinguere diverse sindromi: coleriformi e dissenteriformi, a seconda del meccanismo d'azione dell'agente patogeno. Se quest'ultimo è capace di produrre una enterotossina, che determina un'alterazione dell'attività enzimatica (come la tossina colerica che provoca un'attivazione dell'adenilato ciclasi con accumulo di cAMP e conseguente alterazione dell'equilibrio idro-elettrolitico) si ha una diarrea acquosa con feci molto liquide, nel colera dette ad acqua di riso, prive di emazia e leucociti. Viene detta diarrea acquosa o coleretica. Se il microrganismo, invece, è capace di produrre citotossine con danno cellulare e causare a volte anche ulcerazioni, si ha una diarrea dissenteriforme. Possiamo avere anche microrganismi che non producono enterotossine ma invadono l'enterocita si moltiplicano al suo interno, causando un processo infiammatorio e distruzione cellulare, richiamo di PMN, ulcerazione intestinali con perdita di sangue nelle feci. Siamo di fronte ad una sindrome dissenteriforme caratterizzata da feci liquide e al microscopio sono presenti emazia e leucociti, detta anche diarrea infiammatoria. Il sangue in alcuni casi può essere visibile anche ad occhio nudo, dipende dalla gravità della enterorragia. Nella diarrea da virus, il quale si localizza soprattutto nell'intestino tenue, la presenza del virus nelle cellule determina un aumentato turnover degli enterociti, una migrazione delle cellule immature dalle cripte sui villi, ipertrofia delle cripte intestinali stesse, riduzione dei microvilli e quindi della superficie assorbente. Si ha, così, una forma di diarrea che non è infiammatoria ma acquosa. Al microscopio e evidenziamo se ci sono cellule epiteliali, emazia e leucociti. Le infezioni da salmonella sono diverse a seconda del

tipo; si possono avere delle enteriti dette **salmonellosi minori**, **febbre tifoide** da salmonella maggiori: tifi, paratifi A e B, **setticemie** da salmonella maggiori, esistono però delle salmonella tra le forme minori che sono in grado di invadere il circolo ematico e dare così setticemie. Le forme setticemiche, però, le troviamo solo nel paziente immunodepresso. L'uomo rappresenta la fonte e il serbatoio della salmonella, una volta che il batterio raggiunge l'intestino, tramite la linfa raggiunge i linfonodi e da questi passa in circolo dando una prima fase batteriemia che è fugace e ancora non corrisponde all'inizio della sintomatologia clinica. Dal sangue la salmonella passa negli organi ricchi di cellule del reticolo endotelio (fegato, milza, midollo) dove si moltiplica nei macrofagi. La cellula andrà incontro a lisi e la salmonella si riverserà nuovamente in circolo. È a questo punto che comincia la sintomatologia clinica: febbre, anoressia, alterazione del rene e del fegato, ecc. Da questa sede raggiunge poi la colecisti. Le complicanze possibili, sono: perforazione ed emorragia intestinale. Il batterio è GRAM -, quindi per la presenza del LPS e di porine associate, può portare alla necrosi emorragica. Una volta raggiunta la colecisti, alcuni soggetti non riescono ad eliminarlo, per cui si ha la persistenza dell'infezione e il soggetto diventa portatore sano con nessuna sintomatologia. L'enterite compare circa 6-8 ore dall'ingestione del cibo contaminato, con diarrea, febbre, cefalea; nel tifo il passaggio del batterio in circolo, è responsabile di febbre alta e di torpore. Nelle salmonellosi minori i serbatoi sono dati dagli animali, alimenti e acqua contaminata, mentre per la salmonella tifi il serbatoio è l'uomo. Il periodo di incubazione è di circa 13 gg e poi compare la sintomatologia clinica che corrisponde alla seconda invasione del circolo. È possibile isolare la salmonella dal sangue dalle feci e dalle urine. Se siamo di fronte alla prima fase dell'infezione, cioè all'inizio della sintomatologia la salmonella e nel sangue, quindi si richiede un'emocultura. Nella seconda settimana è nelle feci e si richiede una coprocultura, ma contemporaneamente si sono formati gli anticorpi e quindi si richiede un'indagine sierologica detta di Widal Wright, che è una reazione di agglutinazione. Quando il titolo supera un certo valore, 1:70, la reazione viene considerata positiva. A mano a mano che passa il tempo si riduce la possibilità di trovarla nel sangue, ma aumenta la possibilità di trovarla nelle feci. La Widal si fa nei confronti dell'antigene H della salmonella. Possiamo trovarci in una situazione per cui la Widal risulta positiva per l'antigene H e negativa per l'antigene O o viceversa, o entrambi positivi. Se troviamo presenza di

anticorpi anti-O e anti-H negativi, come interpretiamo la situazione? Gli anticorpi anti-O sono quelli che si formano per primi, gli anti-H si formano successivamente; però mentre i primi scompaiono dopo poco tempo i secondi persistono più a lungo. Se noi troviamo, quindi, positivi gli anti-O diciamo che l'infezione è in atto ed è all'inizio; se troviamo la positività di entrambi, diciamo che l'infezione è stabile; se troviamo solo gli anti-H significa che l'infezione è pregressa o è un soggetto vaccinato. Quando cerchiamo una salmonella o una shigella nelle feci, facciamo prima un terreno di arricchimento, perché nelle feci normalmente ci sono numerosi microrganismi, utilizziamo un terreno al selenito, così in questo terreno liquido i batteri di interesse si moltiplicano rapidamente raggiungendo una certa quantità. Dopo il terreno liquido bisogna fare la semina in un terreno selettivo, tra questi quello più utilizzato è al selenito. Tutti i terreni selettivi sono solidi perché devono permettere lo sviluppo di colonie, possiamo differenziarli in base al colore in quanto c'è sempre una componente che viene utilizzata da alcuni batteri e non da altri ed un indicatore di pH. Nel caso delle salmonelle che non fermentano il lattosio non si formerà acido lattico, quindi non virerà l'indicatore di pH e la colonia apparirà chiara; mentre E.coli, che è un commensale dell'intestino, fermenta il lattosio con produzione di acido lattico, l'indicatore di pH acido diventa rosso e di conseguenza la colonia apparirà rossa. In più in questi terreni vi è..... poiché la salmonella produce idrogeno solforato, si forma solfuro di ferro e le colonie appaiono nere. Queste colonie poi vengono sottoposte all'indagine biochimica che ci conferma la diagnosi. Le shigelle sono altri microrganismi che ritroviamo nella sindrome dissenterica, invadono la cellula intestinale, si moltiplicano al suo interno, provocandone poi la morte. Si ha infiammazione con accorsa di PMN e linfociti, sangue nelle feci. Vi sono diversi tipi di shigelle ed esse non penetrano nell'enterocita attraverso la superficie apicale, ma attraverso la superficie baso-laterale dopo aver attraversato le cellule M che hanno dei microvilli molto piccoli e sottilissimo strato di mucosa. Si moltiplicano al loro interno e attraverso una giunzione passano nella cellula intestinale; mentre la salmonella penetra attraverso la superficie apicale dell'enterocita.

E.coli: esistono numerosi ceppi patogeni per l'intestino, detti enteropatogeni, poi vi sono ceppi patogeni per le vie urinarie che si legano a recettori presenti sulle cellule uroteliali, vi sono anche ceppi patogeni per le meningi, in particolare il ceppo K1 che viene anche detto

E.coli meningitidis, responsabile di meningiti neonatali. Si lega allo stesso recettore della neisseria meningitidis di gruppo B, responsabile anch'essa delle stesse meningiti. Gli ETEC sono enterotossici, capaci di produrre due tipi di tossine, con due azioni differenti: LT che è tremolabile, funziona come la tossina colerica, cioè attiva l'adenilatociclastasi quindi dà una s. coleriforme; shiga-like che funziona come la tossina della shigella, aderisce all'enterocita producendo un assottigliamento dei microvilli ed un'alterazione del citoscheletro dopo interazione con l'actina. Gli ETEC sono enteropoliaderenti, alterano la funzione intestinale ma restano localizzati in superficie e quindi danno una s. coleriforme. Gli E.coli diffusamente aggreganti, DAEC, perché si forma una sola zona di aggregazione e poi diffondono, in questo caso la diarrea è coleriforme. Gli EPEC sono enteropatogeni, hanno una proteina codificata da un plasmide che funziona da fattore di adesione, EAF, anche questi coli si attaccano alla superficie dell'epitelio intestinale, non producono tossine, si riducono i microvilli, determinano una immaginazione dell'epitelio detta a coppa. Gli EIEC, come la shigella penetrano nella cellula intestinale, hanno un grosso plasmide di 140 kb, che codifica per una proteina detta invasina, che consente al batterio non solo di aderire ma anche di invaderla e distruggerla. Si ha così una diarrea dissenteriforme. Distruzione, ulcerazione della mucosa intestinale, la shigella produce tossine, mentre, il coli enteroinvasivo non produce tossine ma distrugge l'epitelio. Gli enteropatogeni, quindi, hanno questo fattore di aderenza, gli enterotossici distruggono la mucosa intestinale, producono tossine con fattori di colonizzazione che permettono l'adesione all'enterocita, come la tossina colerica. Questa tossina è formata da due sub unità A, attiva e B, che si lega al recettore; una volta all'interno della cellula la sub unità A viene scissa in A1 e A2. A1 è il frammento attivo che stacca la nicotinamide dal NAD e si forma nicotinamide e ADP ribosio. Si attiva la proteina Gs che viene scissa in sub unità alfa e beta-gamma, la sub unità alfa attiva l'adenilato ciclastasi con aumento del cAMP e questo attraverso l'attivazione di una chinasi A determina un'alterazione dell'equilibrio idro-elettrolitico della cellula, con perdita di acqua ed elettroliti, quindi si ha diarrea acquosa. La tossina LT si lega alla guanilato ciclastasi con aumento del cGMP e attraverso un'attivazione di una chinasi C determina sempre alterazione dell'equilibrio idroelettrolitico e quindi diarrea acquosa. La tossina shiga-like prodotta da un ceppo di E.coli enteroemorragico, è costituita anch'essa da due sub unità A e B. Entrambe vengono

internalizzate mediante endocitosi recettore mediata, poi il dimero viene scisso e la sub unità A in A1 e A2. A1 si lega ai ribosomi, stacca un'adenina e inibisce la sintesi proteica con morte cellulare. Sia la tossina shiga-like che quella dell' E.coli dysenteriae hanno la stessa azione, raggiunge gli enterociti, altera l'epitelio, a livello del colon produce una colite emorragica (dissenteria bacillare caratteristica dei coli EHEC), può passare in circolo, raggiunge il SRE e si ha una sindrome uremico-emolitica, caratterizzata da: anemia emolitica, insufficienza renale e piastrinopenia I cibi più importanti per la contaminazione sono le carni poco cotte, per gli EHEC.

Diagnosi

I coli responsabili della s. uremico emolitica EHEC sono sorbitolo negativi, rispetto agli altri coli che utilizzano il sorbitolo.

La prof. dice di dover studiare autonomamente l'helicobacter pylori con tutta la parte diagnostica.

PS: Le slides di questa lezione sono da Mr.service.