EBOOKECM JOURNAL
N. 7 - SETT 2023

ANTIBIOTICO RESISTENZA LA PANDEMIA NASCOSTA

LA PANDEMIA NASCOSTA
ANTIBIOTICO RESISTENZA

ARTICOLI SELEZIONATI E TRADOTTI DA

Journal of Intensive Care // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology // BMC Microbiology // International Journal of Environmental Research and Public Health // Pathogens // Antibiotics // Upsala Journal of Medical Sciences // Veterinary World

La presente pubblicazione è accreditata come **corso ECM FAD** solo attraverso apposita registrazione su www.ebookecm.it

EBOOKECM JOURNAL

Titolo: ANTIBIOTICO RESISTENZA – La pandemia nascosta
Curatela: Maria Laura Ferrando
Traduzioni: Giuditta Spassini
Editing e copertina: Attilio Scullari
Concept copertina: Licia Casula
Direzione editoriale: Mario Marcello Verona, Alessandra Pontis
Supervisione scientifica: Carlo Duò, Alessandra Pontis
Data Pubblicazione: 30 settembre 2023

Licenza Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)
Questa pubblicazione è liberamente scaricabile, copiabile e ridistribuibile su ogni media o in ogni formato, previa citazione completa delle fonti e indicazione delle eventuali modifiche effettuate. Non è possibile invece distribuire la pubblicazione per fini commerciali diretti o indiretti.
Leggi il testo della licenza integrale.

COLLANA EBOOKECM
EBOOK PER L'EDUCAZIONE CONTINUA IN MEDICINA © 2022

ISBN: 9791281289079
ISSN: 2785-2911

BOOKIA SRL. Servizi di editoria accreditata, Piazza Deffenu 12, 09125 Cagliari.

INDICE

INTRODUZIONE. Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta una minaccia globale 4

1 - La resistenza antimicrobica e la sua diffusione sono una minaccia globale 17

2 - Resistenza batterica agli agenti antimicrobici 41

3 - Resistenza antimicrobica: l'approccio One Health 70

4 - Resistenza batterica agli antibiotici: i patogeni più critici 84

5 - Definire la resistenza agli antibiotici: verso un'armonizzazione internazionale 102

6 - Diversità molecolare tra β-lattamasi a spettro esteso e carbapenemasi, e resistenza antimicrobica 121

7 - I fattori di virulenza, biofilm e resistenza agli antibiotici di *Klebsiella pneumoniae* 146

8 - Biologia dell'*Acinetobacter baumannii*: patogenesi, meccanismi di resistenza agli antibiotici e opzioni terapeutiche future 166

9 - Non è facile essere green: una revisione narrativa sulla microbiologia, la virulenza e le prospettive terapeutiche di *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai farmaci 213

10 - Ingegneria del genoma batterico e biologia sintetica: lotta agli agenti patogeni 250

Abbreviazioni 271

Le fonti di questo numero 272

INTRODUZIONE
IL FENOMENO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA RAPPRESENTA UNA MINACCIA GLOBALE

L'antibiotico-resistenza (Antimicrobial Resistance, AMR) rappresenta una reale minaccia per la salute umana a livello globale. La comunità scientifica la definisce la "pandemia nascosta", in quanto è un problema sanitario che ha una divulgazione mediatica limitata ma che provoca centinaia di migliaia di morti ogni anno. La resistenza antimicrobica è la capacità dei microorganismi intrinseca o acquisita di sopravvivere all'azione batteriostatica o battericida dell'antibiotico, determinandone l'inefficacia in caso di trattamento di un'infezione. La Commissione Europea ha documentato il verificarsi di decessi correlati all'AMR attestandosi a circa 37.000/anno nell'Unione Europea (UE), con un costo di circa 1,5 miliardi di euro/anno di spese sanitarie (https://www.epicentro.iss.it/infezioni-correlate/impatto-salute-economia). Un rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2017 (OMS, Ginevra, Svizzera) ha confermato che il mondo intero rimarrebbe senza antibiotici, in quanto i farmaci di ultima generazione esistenti nell'uso clinico sono stati sviluppati attraverso modifiche alle classi esistenti e hanno dimostrato di avere cicli di totale efficacia brevi (si veda il cap. 1). Ad aggravare una situazione già compromessa, durante la prima ondata la pandemia da coronavirus (COVID-19) avvenuta nel 2020 sono stati utilizzati diversi farmici tra cui gli antibiotici (soprattutto azitromicina, https://www.aifa.gov.it) come possibile cura che potesse apportare dei benefici nei casi gravi di Covid-19, ma che non possiedono nessuna azione terapeutica contro il virus.

Il crescente problema della resistenza è causato da diversi fattori quali la mancanza di una rapida diagnosi di infezione batterica, prescrizione impropria di terapia antibiotica o di antibiotici ad ampio spettro e utilizzo scorretto ed eccessivo di antimicrobici sia da parte negli esseri umani che negli animali.

Di fatto sembra che l'ambiente e gli animali giochino un ruolo chiave nello sviluppo, nella trasmissione e nella diffusione della resistenza antimicrobica. È dunque fondamentale oggi giorno rapportarsi al problema dell'AMR attuando un moderno approccio di tipo "One Health" in cui si riconosce che la salute dell'uomo, dell'ambiente e degli animali sono interconnessi e dipendono tra di loro (cap. 2). Per contrastare la diffusione dell'AMR è necessario, pertanto, attuare una stretta sorveglianza partendo da una raccolta di dati di AMR provenienti da diversi settori quale uomo-ambiente-animale a livello globale. Negli ultimi decenni si sono attuati studi con approccio "One Health" di sorveglianza del resistoma in siti non solo clinici ma anche ambientali e animali. Sono stati quindi adoperati metodo di rilevamento dell'AMR utilizzando il sequenziamento dell'intero genoma del batterio (Whole Genome sequencing, WGS) applicando le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation-Sequencing, NGS). L'applicazione dell'NGS alla microbiologia clinica ha rivoluzionato la diagnostica dei microorganismi e presenta diversi vantaggi rispetto alle tradizionali piattaforme di test di resistenza. L'NGS è un prezioso alleato per ottenere delle indagini rapide e dettagliate sulla sorveglianza e diffusione dell'AMR che per ora viene utilizzato in alcuni centri ospedalieri all'avanguardia anche nel territorio nazionale. Si auspica che l'utilizzo del NGS affianchi al più presto le metodiche tradizionali per ottenere una diagnosi sempre più dettagliata della resistenza antimicrobica.

Dal 1997 è stato istituito il comitato scientifico "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) che detta le linee guida internazionali per interpretare la resistenza antimicrobica eseguite mediante metodiche tradizionali (cap. 3). Per ogni tipo di microrganismo, l'EUCAST individua una serie di principi attivi che devono essere testati, perché si ritiene che siano i più adatti per quella specie batterica e perché è meno probabile che possano indurre pericolosi fenomeni di resistenza. Dal momento che l'AMR è in continua evoluzione, l'EUCAST

garantisce un aggiornamento costante dei dati, a vantaggio della concreta fruibilità dal punto di vista clinico.

Sempre più diffuse e allarmanti sono le infezioni nosocomiali, ossia infezioni acquisite in ambito ospedaliero, causate da batteri patogeni multiresistenti (Multi-Drug Resistant, MDR). Si intende per infezione ospedaliera (Hospital-Acquired Infections, HAIs) la comparsa dell'infezione durante o dopo il ricovero del paziente in ospedale, mentre si considerano infezione comunitarie (Community-Acquired Infections, CAIs) tutte quelle contratte in comunità prima dell'ospedalizzazione presenti quindi già all'ammissione. È noto che le infezioni ospedaliere colpiscono in media il 5-10% dei pazienti ricoverati che risultano spesso immunocompromessi. Negli anni recenti l'incremento di AMR nei casi infezioni nosocomiali è stato allarmante. I maggiori patogeni MDR, che sono la principale causa di infezioni ed epidemie nosocomiali, sono raggruppati sotto l'acronimo "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp). Quindici anni fa, ci si focalizzava sui patogeni Gram-positivi che circolavano negli ospedali, come lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), e gli Enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE). Oggi, tuttavia, i riflettori si sono spostati sui patogeni Gram-negativi, in particolare Enterobatteriacee MDR. Parecchi patogeni gram-negativi altamente resistenti, vale a dire le specie appartenetti a *Klebsiella*, *Acinetobacter, Pseudomonas aeruginosa ed Enterobacter* multi-resistente ai farmaci e resistenti ai carbapenemi, sono emersi come agenti patogeni significativi a livello globale (cap. 4). In particolare, negli ultimi 15 anni, le β-lattamasi a spettro esteso e, negli ultimi 10 anni, le carbapenemasi mobili (ad esempio, la metallo-β-lattamasi 1 di New Delhi, NDM-1) sono diventate globalmente ubiquitarie nei patogeni Gram-negativi (cap. 5); e negli ultimi 3 anni, la scoperta di un meccanismo mobile di resistenza alla colistina, MCR ha fatto sì che alcuni ceppi siano virtualmente incurabili con la nostra attuale farmacopea. Il capitolo 5 infatti descrive i principali meccanismi di resistenza degli antibiotici β-lattamici (es.: β-lattamasi

a spettro esteso (ESBL) e carbapenemasi) che è la classe di antibiotici più frequentemente utilizzata in terapia.

I capitoli 6 e 7 saranno rispettivamente dedicati ad un maggiore approfondimento sulle caratteristiche di patogenesi e di resistenza di *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* in quanto considerati di priorità critica nell'emergenza dell'AMR sia a livello internazionale che nazionale. Tuttavia, un'elevata incidenza di infezioni causate *Pseudomonas aeruginosa* continua ad aumentare negli ambienti ospedalieri a livello globale. Il capitolo 8 è pertanto dedicato ai recenti aggiornamenti clinici e di ricerca su *P. aeruginosa*.

Infine, nel capitolo 9 si parlerà di possibili sviluppi nel campo della terapia alternative ancora sottofase di sperimentazione per una terapia antimicrobica che include l'impiego di fagi e il sistema CRISPR/Cas9 con cui viene eseguito una sorta di modifica a livello genomico ("Genome editing") batterico per eliminare i geni di resistenza agli antibiotici.

1 [1,2] – LA RESISTENZA BATTERICA AGLI AGENTI ANTIMICROBICI

Nella prima parte verranno brevemente descritte le principali classi di antibiotici e i possibili meccanismi di resistenza associata alle classi degli Ab[1].

Lo sforzo dei clinici microbiologi è proteso nell'identificazione dei fattori molecolari che contribuiscono all' insorgenza della antibiotica resistenza e alla sua trasmissione della stessa all'interno di una comunità batterica.

[1] Gli agenti antimicrobici possono essere suddivisi in gruppi in base al loro meccanismo d'azione. I gruppi principali sono: 1) agenti che inibiscono la sintesi della parete cellulare 2) depolarizzano la membrana cellulare 3) inibiscono la sintesi proteica 4) inibiscono la sintesi degli acidi nucleici e 5) inibiscono le vie metaboliche nei batteri. I principali meccanismi di resistenza sono causata da limitazione dell'assorbimento di un farmaco, modifica del bersaglio di un farmaco, inattivazione di un farmaco ed efflusso attivo di un farmaco. Questi meccanismi possono essere nativi dei microrganismi o acquisiti da altri microrganismi. La diffusione è data da elementi genetici trasmissibili attraverso una complessi *pahthaway* genetici tra batteri.

In tal senso, le tecnologie di sequenziamento genetico di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) hanno rivoluzionato la diagnostica nella microbiologia medica, aiutando il rilevamento in tempo reale delle cause della resistenza antimicrobica e dei suoi elementi.

L'NGS è di grande supporto nella lotta contro la minaccia resistenza antibiotica. Tramite sequenziamento dell'intero genoma di microorganismo (Whole Genome Sequencing, WGS) si possono ottenere un'enorme quantità di informazioni sul patrimonio genetico, tra cui il "resistoma", ossia l'insieme dei geni che conferiscono resistenza (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) ai batteri sia patogeni che non-patogeni. La metagenomica è l'approccio attualmente più utilizzato per decifrare il resistoma.

Negli ultimi decenni si sono attuati studi di sorveglianza del resistoma atti a mitigare l'AMR che presenta diversi vantaggi rispetto tradizionali piattaforme di test di resistenza. L' WGS, infatti, permette di stabilire l'identificazione della specie microbica, il genotipo (es.: Sequence Type, ST), la creazione di relazioni filogenetiche tra i batteri, il rilevamento delle mutazioni, l'identificazione di nuovi geni putativi e la previsione della suscettibilità fenotipica agli antibiotici. Il WGS è stata la tecnologia scelta in molte circostanze che hanno comportato il tracciamento delle fonti di focolai e la formazione di politiche per il richiamo di sorgenti ambientali contaminati quali alimenti, animali o ambiente. Il WGS ha permesso la scoperta dell'esistenza di co-resistenza ad altri agenti antibiotici; e previsioni sull'identificazione del trasferimento genico orizzontale tra batteri.

Si prospetta un'applicazione più diffusa dell'NGS che potrebbe fornire il profilo specifico dell'AMR del patogeno infettante permettendo di trattare il paziente con una terapia personalizzata e mirata limitando l'impiego di antibiotici ad ampio spettro.

2 [3] – RESISTENZA ANTIMICROBICA: UNA PROSPETTIVA "ONE HEALTH"

La seconda parte si descrive un approccio di tipo multidisciplinare, multisettoriale e coordinato per affrontare le minacce per la salute nell'interfaccia uomo-animale-ambiente, che sono parte del concetto "One Health". L'approccio "One Health" si basa sul riconoscimento che la salute umana, animale e ambiente dell'ecosistema interagiscono indissolubilmente. Esiste un elevato impiego di antimicrobici nel campo veterinario e agricolo. La gestione impropria di antimicrobici, il controllo inadeguato delle infezioni o di inquinanti nell'ambiente, e la migrazione di persone e animali infettati da batteri resistenti facilitano la diffusione della AMR che può facilmente trasferirsi tra e all'interno dei diversi ecosistemi e popolazioni. Infatti, esistono "i batteri zoonotici" capaci di colonizzare sia animale che uomo in grado, e non solo sono gli agenti eziologi di malattie infettive per entrambi gli ospiti, ma possono trasmettere anche geni di AMR presenti nel loro genoma. Batteri zoonotici resistenti possono infatti trovarsi nel suolo e da lì, possono infettare piante, ortaggi e frutti che possono entrare in contatto con l'uomo.

Il volume degli antimicrobici utilizzato negli animali in tutto il mondo è stimato essere maggiore che negli esseri umani. La maggior parte delle classi di antimicrobici utilizzate negli esseri umani sono utilizzati per gli animali e talvolta nelle piante, comprese le classi di antimicrobici vitali per la medicina umana, come ad esempio β-lattamici ad ampio spettro e chinoloni. Particolari esempi di come l'uso di antibiotici in pazienti umani e allevamenti di animali costituisca un rischio per la salute globale è dato dall'impiego di Colistina, cefalosporine di terza generazione e fluorochinoloni che hanno causato un aumentato dell'incidenza di AMR a tali classi di antibiotici negli allevamenti a livello globale. Inoltre, anche antibiotico destinato al solo uso veterinario può causare la co-selezione di antibiotici utilizzati in pazienti in terapia clinica. È questo il caso degli ionofori che possiedono attività antibatterica, principalmente contro i batteri

Gram-positivi e vengono utilizzati in allevamenti di polli sotto forma di promotori di crescita. È stato infatti dimostrato che la resistenza allo ionoforo Narasin può essere trasferita tra ceppi di enterococchi di interesse clinico mediante coniugazione di un plasmide che in genere veicola anche la resistenza alla vancomicina. Quindi particolare attenzione deve essere posta all'utilizzo degli antibiotici in ambiente agricolo e veterinario.

3 – EUCAST [4]: DEFINIZIONE DI LINEE GUIDA ALL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

Il test di suscettibilità ad un antibiotico (AST) o antibiogramma (ABG) è un test che consente la valutazione della sensibilità batterica *in vitro* a vari antibiotici e quindi stabilire qual è l'antibiotico più efficace per quel batterio. La sua esecuzione prevede l'esposizione del microrganismo in esame a una serie di definite concentrazioni di farmaci. Tramite diversi metodi utilizzati per eseguire un antibiogramma (es. metodo del farmaco tramite diluizione in brodo o dischetti imbevuti di antibiotico) si stabilisce la Minima Concentrazione Inibente (MIC), ossia la più bassa concentrazione del farmaco in grado di inibire la crescita *in vitro* del microrganismo saggiato. L'antibiogramma deve essere eseguito attraverso metodiche validate, effettuando costanti Controlli Interni Qualità e partecipando a programmi di Valutazione Esterna di Qualità.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) è un comitato scientifico per la definizione di linee guida per interpretare la resistenza antimicrobica. Nasce nel 1997 da membri dell'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID) ed ha il preciso scopo di fornire i valori soglia (breakpoints) sempre aggiornati per la lettura dei test di sensibilità antimicrobica da parte dei laboratori di microbiologia di tutta Europa. Le MIC vengono poi rapportate a breakpoints stabiliti dallo EUCAST in funzione di un complesso insieme di parametri: microbiologici, farmacologici (rapporto

tra farmacocinetica/farmacodinamica e risposta al trattamento) e clinici (evidenze dalla letteratura).

Attraverso il confronto con i breakpoints, i risultati ottenuti possono essere tradotti nelle cosiddette categorie di interpretazione (Sensibile (S), Intermedio (a sensibilità intermedia, I), Resistente (R)).

L'EUCAST, ha definito il Cut-Off Epidemiologico (ECOFF), che è il valore di MIC che divide i ceppi wild-type (che non hanno meccanismi di resistenza acquisita e mutazioni) dalla popolazione di ceppi che ha sviluppato meccanismi di resistenza. I breakpoints epidemiologici vengono impieganti per valutare la terapia antibiotica e dosaggi terapeutici. In tale parte verranno descritti la versione più aggiornata delle regole di interpretazione di suscettibilità per specie batterica, aggiornate in linea con gli attuali breakpoint EUCAST.

4 [5] – PATOGENI RESISTENTI, NESSUNA CURA ANTIBIOTICA: NO "ESKAPE"

Affrontiamo una crescente resistenza tra batteri gram-positivi e gram-negativi patogeni che causano infezioni sia in ospedale e che in comunità. Nel 2008 Louis Rice li ha segnalati come i patogeni "ESKAPE" (acronimo per raggruppare 6 specie di patogeni MDR: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter sp*) a sottolineare che attualmente riescono a "sfuggire" (*escape*) all'azione "biocida" degli antibiotici. Si tratta di batteri che hanno acquisito multi-resistenza anche ai farmaci di ultima generazione della classe dei β-lattamici quali cefalosporine e carbapenemi. Curare le infezioni nosocomiali causate da batteri "ESKAPE" può essere difficile, poiché le opzioni terapeutiche che rimangono disponibili sono rappresentate da altri pochi antibiotici che spesso sono tossici e non sempre efficaci, e talora possono non esservi alternative terapeutiche. In questa parte 4ª si descrive lo stato attuale di AMR nei patogeni ESKAPE, con

particolare attenzione allo sviluppo di farmaci attuali ed emergenti vie nella risposta contro la resistenza antimicrobica.

5 [6] – RESISTENZA ANTIMICROBICA CAUSATA DA β-LATTAMASI AD AMPIO SPETTRO E CARBAPENEMASI

Gli antibiotici β-lattamici sono gli agenti antibatterici di uso frequente in terapia. Le β-lattamasi ad ampio spettro (ESBL) e carbapenemasi conferiscono resistenza non solo ai carbapenemi, ma ad antibiotici quali penicillina, cefamicine e cefalosporine. I meccanismi di resistenza ai β-lattamici sono mediati da una ridotta permeabilità al farmaco, e dalla produzione di pompe di espulsione o di enzimi β-lattamasi che alterano e inattivano gli antibiotici β-lattamici mediante idrolisi dell'anello beta-lattamico. Il trasferimento genico orizzontale è il meccanismo più comune associato alla diffusione di ESBL e carbapenemasi tra specie batteriche patogene. Insieme all'aumento della resistenza antimicrobica, sono emersi diversi tipi di ESBL e carbapenemasi con differenti caratteristiche enzimatiche. Per esempio, le carbapenemasi recentemente scoperte sono raggruppate nelle classi da A e D del sistema di classificazione di Ambler.

I batteri possono ospitare diversi tipi di ESBL (es.: fino a 9 geni AMR trasportati da plasmidi riscontrati in *K. pneumoniae*) e carbapenemasi e richiedono strategie terapeutiche specifiche. È quindi essenziale per medici comprendere le caratteristiche di resistenza dei patogeni infettivi.

In questo capitolo, riassumiamo le attuali conoscenze sulla resistenza ai beta-lattamici da ESBL e carbapenemasi, come carbapenemasi di classe A, classe C AmpC a spettro esteso (ESAC), beta-lattamasi di classe D idrolizzanti i carbapenemi (CHDL) e metallo-β-lattamasi di classe B, per indirizzare una possibile scelta terapeutica in casi di infezioni particolarmente gravi causate da batteri MDR e Carbapenemi-resistenti.

6 [7] – CARATTERISTICHE DI VIRULENZA, ANTIBIOTICO RESISTENZA DI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Klebsiella pneumoniae (KP) è una delle principali cause di infezioni nosocomiali opportunistiche a livello globale tanto da essere recentemente riconosciuta dall'OMS di priorità critica tra i patogeni associati alle infezioni nosocomiali (https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato4135670.pdf) assieme altre due specie di enterobatteriacee quali *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. *K. pneumoniae*, che è intrinsecamente resistente alla ampicillina e può acquisire prontamente beta-lattamasi a spettro esteso (Extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) o carbapenemasi (*Klebsiella* producing carbapenemase, KPC) che conferiscono rispettivamente resistenza a cefalosporine di terza generazione o carbapenemi, lasciando opzioni molto limitate per la terapia antimicrobica. *K. pneumoniae* è un chiaro opportunista, che colonizza l'intestino umano, la rinofaringe e la pelle. È stato dimostrato che la colonizzazione asintomatica da *K. pneumoniae* può essere una fonte di HAI, con tassi di infezione stimati tra il 4 e il 35% in ricoverati ospedalieri colonizzati. Le infezioni nosocomiali provocate da KP comprendono infezioni del tratto urinario (UTI), polmonite, infezioni di ferita e sepsi. *K. pneumoniae* mostra una propensione alla diffusione in ambiente nosocomiale provenienti da diverse fonti quali lavandini, scarichi, dispositivi medici e tutti i prodotti per la pulizia. Mente, in ceppi KP isolati da molteplici contesti non-clinici quali bestiame o acque reflue sono stati rilevati geni che codificano per le carbapenemasi e potrebbero essere una possibile sorgente di trasmissione.

Relativamente poco si conosce della patogenesi di *K. pneumoniae*, rispetto a patogeni "veri" correlati della famiglia Enterobatteriacee, come ad esempio *Salmonella* o *Shigella*.

In questa parte, si riassumeranno i meccanismi di virulenza, biofilm e tolleranza agli antibiotici di *K. pneumoniae* e verrà esplorato l'applicazione del sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome sequencing — WGS) e della proteomica globa-

le, per fornire nuove prospettive nel trattamento clinico di infezioni da KP.

7 [8] – *ACINETOBACTER BAUMANNII*: PATOGENESI, RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E PROSPETTIVE DI TRATTAMENTO

Negli ultimi anni le infezioni di *Acinetobacter baumannii* sono notevolmente incrementate sia in ambito ospedaliero che comunitario. L'ampio uso di chemioterapia antimicrobica, in particolare carbapenemi, ha contribuito alla comparsa di *A. baumannii* (CRAb) resistente ai carbapenemi, che di solito presenta un fenotipo MDR. La resistenza ai carbapenemi in *A. baumannii* può essere causata da diversi meccanismi ma risulta prevalentemente mediata dalle β-lattamasi di classe D che idrolizzano i carbapenemi (CHDL). Le CHDL, dette anche oxacillinasi, possono essere intrinseche (OXA-51 like) o acquisite (OXA-23 like, -24/40 like, -58 like e -143 like). Come dimostrato in precedenti pubblicazioni la resistenza ai carbapenemi in Italia in *A. baumannii* è prettamente associata alla CHDL OXA-23 che risulta essere endemico ormai in Italia. In questa parte riassumiamo gli studi attuali sui fattori di virulenza e i meccanismi di resistenza che contribuiscono alla patogenesi di *A. baumannii*.

8 [9] – NON È FACILE ESSERE VERDI: MICROBIOLOGIA, VIRULENZA E PROSPETTIVE TERAPEUTICHE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MULTI RESISTENTE AI FARMACI

Pseudomonas aeruginosa (PA) è la causa più frequente di infezione tra i batteri Gram-negativi non fermentanti, colpisce prevalentemente i pazienti immunocompromessi, ma il suo ruolo patogeno non deve essere trascurato nei pazienti immunocompetenti. Questi agenti patogeni rappresentano una sfida terapeutica preoccupante per i medici, sia in comunità che in ambito ospedaliero, a causa della loro crescente prevalenza di multi-resistenza

ai farmici (MDR), e questo può portare a terapia prolungata, sequele e mortalità eccessiva nella popolazione di pazienti affetti. In questa parte, forniamo una panoramica della ricerca di base e clinica sulla PA e riassumiamo l'ampio corpus di letteratura su epidemiologia, trasmissione, diversità genetica, evoluzione, sorveglianza e trattamento di infezione causate da PA-MDR.

9 [10] – INGEGNERIA DEL GENOMA BATTERICO E BIOLOGIA SINTETICA: LE NUOVE PROSPETTIVE PER COMBATTERE I PATOGENI

L'avvento di nuovi strumenti di ingegneria del genoma batterico e di biologia sintetica (SB) sta fornendo piani diagnostici e terapeutici promettenti per monitorare e trattare infezioni batteriche recalcitranti diffuse. I principali progressi negli approcci di ingegneria genetica possono aiutare con successo a individuare e modificare i genomi batterici patogeni per comprendere e mitigare i meccanismi di resistenza ai farmaci. In questa ultima parte, discutiamo l'applicazione di specifici metodi di ingegneria del genoma e SB come la ricombinazione, le brevi ripetizioni palindromiche regolarmente inter-spaziate (CRISPR) e i meccanismi di segnalazione delle cellule batteriche per il targeting dei patogeni. Il sistema CRISPR/Cas9 (si pronuncia "crisper") si basa sull'impiego della proteina Cas9, una sorta di forbice molecolare in grado di tagliare un DNA bersaglio, che può essere programmata per effettuare specifiche modifiche al genoma di una cellula eucariotica o un batterio.

A seguito del taglio introdotto da Cas9, attraverso opportuni accorgimenti, è infatti possibile eliminare o correggere sequenze che per esempio conferiscano resistenza antibiotica dal genoma del batterio patogeno.

Viene inoltre evidenziata l'utilità di questi strumenti nello sviluppo di strategie antibatteriche come la produzione di nuovi antibiotici, la terapia dei fagi, la diagnostica e la produzione di vaccini.

BIBLIOGRAFIA

[1] Aljeldah, M. M. Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **11**, (2022).

[2] Varela, M. F. *et al.* Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **10**, (2021).

[3] Velazquez-Meza, M. E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B. & Alpuche-Aranda, C. M. Antimicrobial resistance: One Health approach. *Vet. world* **15**, 743–749 (2022).

[4] Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens. 2021; 10(10):1310. https://doi.org/10.3390/pathogens10101310

[5] Kahlmeter G. (2014). Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. Upsala journal of medical sciences, 119(2), 78–86. https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901446

[6] Sawa, T., Kooguchi, K. & Moriyama, K. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J. intensive care* **8**, 13 (2020).

[7] Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L. & Wang, H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, (2020).

[8] Lee, C.-R. *et al.* Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 55 (2017).

[9] Behzadi, P., Baráth, Z. & Gajdács, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **10**, (2021).

[10] Krishnamurthy, M., Moore, R. T., Rajamani, S. & Panchal, R. G. Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens. *BMC Microbiol.* **16**, 258 (2016).

1 - LA RESISTENZA ANTIMICROBICA E LA SUA DIFFUSIONE SONO UNA MINACCIA GLOBALE

Tratto e tradotto da
Aljeldah M.M., *Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat*. Antibiotics 2022, 11, 1082.

https://doi.org/10.3390/antibiotics11081082

Abstract
La resistenza antimicrobica (AMR [*Anti Microbial Resistance*]) è in tutto il mondo un ostacolo al benessere umano, ed è una delle più gravi preoccupazioni per la salute pubblica. Se non controllata, la resistenza antimicrobica può diventare una grave minaccia e generare un'altra pandemia. Ciò rende necessario definire soluzioni sanitarie alla resistenza antimicrobica che siano su scala globale, tenendo conto dei dati provenienti da diverse parti del mondo. Questo processo potrebbe essere facilitato dalla definizione di norme sociali, da pratiche comportamentali individuali e di gruppo che favoriscano la salute umana globale e, infine, dall'aumento della consapevolezza collettiva sulla necessità di tali azioni. Oltre a rappresentare un'emergenza in ambito clinico, la resistenza antimicrobica rende anche necessari dei trattamenti più complessi, ponendo una vera e propria sfida alle linee guida esistenti sulla gestione della resistenza agli antibiotici. Lo sviluppo della resistenza è stato collegato a molti elementi genetici dei microbi, in alcuni casi con complesse vie di trasmissione. Inoltre, si stanno scoprendo nuovi meccanismi alla base dello sviluppo della resistenza antimicrobica, cosa che rende questo campo importante per la microbiologia medica. Oltre agli aspetti genetici della resistenza antimicrobica ci sono altri fattori, tra cui la diagnosi errata, l'esposizione ad antibiotici ad ampio spettro e la mancanza di una diagnosi rapida; questi fattori contribuiscono alla creazione della resistenza. Tuttavia i miglioramenti e le innovazioni nelle tecnologie di sequenziamento del DNA e nella bioinformatica hanno rivoluzionato il settore diagnostico, favorendo l'individuazione in tempo reale delle

cause dell'AMR e dei suoi elementi importanti per delineare approcci di controllo e prevenzione per combattere la minaccia.

1.1 INTRODUZIONE

Nel 1928 Alexander Fleming scoprì che la penicillina uccideva i batteri stafilococchi che stava esaminando. Ben presto divenne l'antibiotico chiave per il trattamento delle principali malattie causate da patogeni Gram-positivi [1]. La penicillina è stata il primo antibiotico naturale ad essere scoperto, anche se il Salvarsan è stato utilizzato per la prima volta nel 1910. La scoperta degli antibiotici è stata considerata il fondamento di molti dei più grandi progressi medici del XX secolo [2]. L'era della scoperta degli antibiotici ha reso relativamente più sicuri gli aspetti terapeutici e chirurgici della medicina clinica, comprese le procedure per il parto, i trapianti di organi e il trattamento del cancro [3]. Ci sono poi gli antivirali, che hanno trasformato gli aspetti di gestione clinica delle malattie virali, compresa la recente pandemia di coronavirus del 2019. Uno dei maggiori attributi degli antivirali è la capacità di rendere gestibile il virus dell'immunodeficienza umana (HIV).

Gli agenti patogeni microbici continuano a evolversi e a sviluppare resistenza alle metodologie terapeutiche emergenti e quelle tradizionali; dato l'estremo declino della ricerca sugli antibiotici, ciò non ha fatto altro che aumentare la portata della resistenza antimicrobica e il suo impatto sui costi e sui risultati dell'assistenza sanitaria globale. Il dilagante aumento dell'uso di antibiotici anche da banco non ha fatto altro che alimentare la resistenza antimicrobica. Ciò aumenta anche il rischio di riemergenza di molte malattie; l'emergere della XDR-TB, la tubercolosi estensivamente resistente ai farmaci, è un esempio che vale la pena citare.

Gli antibiotici sono un pilastro della medicina moderna. Il loro uso ha ridotto la mortalità infantile. Inoltre, sono fonda-

mentali per gli interventi chirurgici invasivi e per i trattamenti complessi come la chemioterapia. Sono un ausilio insostituibile nella complessa era degli interventi chirurgici a guida robotica e per la gestione delle infezioni secondarie durante le malattie, ad esempio la comune influenza e le infezioni della pelle, dell'intestino, ecc.

Tuttavia, le infezioni da batteri multiresistenti sono in aumento a livello globale, facendo sì che lo spauracchio delle infezioni non curabili diventi una realtà. Un rapporto del 2017 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, Ginevra, Svizzera) ha confermato che l'intero mondo sarà a corto di antibiotici poiché i farmaci attualmente in uso clinico sono stati sviluppati attraverso delle modifiche alle classi esistenti e hanno dimostrato di avere dei cicli di impatto brevi [4]. La Commissione europea ha documentato che i decessi legati all'AMR sono circa 33.000 all'anno nell'Unione europea (UE), per circa 1,5 miliardi di euro all'anno in costi sanitari [5].

Il rapporto 2019 sulla minaccia della resistenza agli antibiotici pubblicato dal *Center for Disease Control and Prevention* ha stimato che i casi di resistenza antimicrobica sono oltre 2,8 milioni all'anno negli Stati Uniti, con oltre 35.000 decessi. Il rapporto ha inoltre dettagliato i rischi nelle categorie "urgente", "grave", "preoccupante" e "da tenere d'occhio"; la resistenza ai carbapenemi è stata considerata urgente. L'emergere di batteri resistenti ai carbapenemi solleva una seria preoccupazione, in quanto questi sono classificati come gli antibiotici "di ultima linea" per il trattamento delle infezioni multiresistenti. I risultati positivi della ricerca hanno documentato nuove combinazioni di antibiotici che abbattono la resistenza, il che amplia l'uso degli antibiotici di ultima linea [6]. La Tabella 1 e la Figura 1 riassumono i diversi meccanismi alla base dello sviluppo della resistenza agli antibiotici.

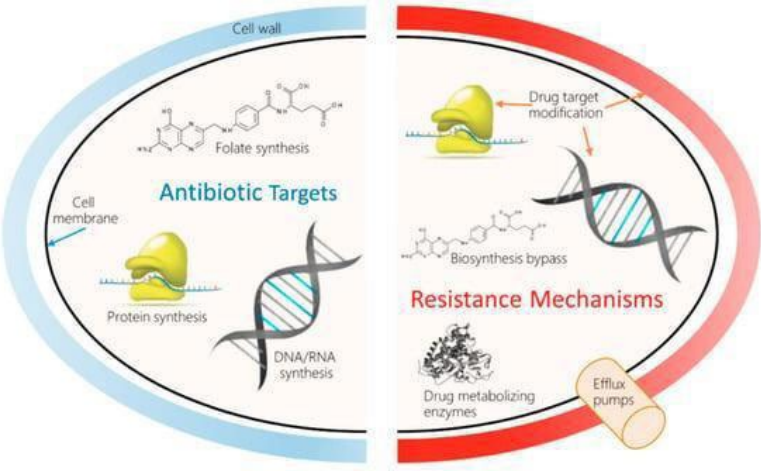


Figura 1. *Meccanismi molecolari della resistenza antimicrobica (AMR) e della resistenza ai farmaci.*

Meccanismo di resistenza	Tipo di antibiotico	Esempio
Idrolisi, efflusso, bersaglio alterato	β-Lattamici	Penicilline, cefalosporine, penematici, monobattami
Fosforilazione, acetilazione, nucleotidilazione, efflusso, alterazione del bersaglio	Aminoglicosidi	Gentamicina, Streptomicina, Spettinomicina
Riprogrammazione della biosintesi del peptidoglicano	Glicopeptidi	Vancomicina, Teicoplanina
Monoossigenazione, bersaglio alterato, efflusso	Tetracicline	Minociclina, Tigeciclina
Idrolisi, efflusso, alterazione del bersaglio, glicosilazione, fosforilazione,	Macrolidi	Eritromicina, azitromicina
Nucleotidilazione, efflusso, bersaglio alterato	Lincosamidi	Clindamicina
Carbonio-Ossigeno liasi, efflusso, bersaglio alterato, acetilazione,	Streptogramine	Synercid
Efflusso, bersaglio alterato	Ossazolidinoni	Linezolid

Acetilazione, alterazione del bersaglio, efflusso,	Fenicoli	Cloramfenicolo
Acetilazione, alterazione del bersaglio, efflusso,	Chinoloni	Ciprofloxacina
Efflusso, bersaglio alterato	Pirimidine	Trimetoprim
Efflusso, bersaglio alterato	Sulfamidici	Sulfametossazolo
ADP-ribosilazione, bersaglio alterato, efflusso,	Rifamicine	Rifampicina
Obiettivo alterato	Lipopeptidi	Daptomicina
Bersaglio alterato, efflusso	Peptidi cationici	Colistina

Tabella 1. *Meccanismi di resistenza agli antibiotici.*

1.2 SVILUPPO E IDENTIFICAZIONE DI NUOVI ANTIBIOTICI E RIPROPOSIZIONE DI QUELLI ESISTENTI

È stato raccomandato di tenere l'uso degli antibiotici sotto controllo, in modo da affrontare l'aumento dell'incidenza della resistenza agli antibiotici; c'è anche l'urgente necessità di identificare nuove molecole bersaglio e di riprogettare quelle esistenti per affrontare le crescenti avversità dei patogeni MDR [*Multi Drug-Resistant*] e XDR [*Extensively Drug-Resistant*]. Gli aspetti da sviluppare sono:

i. un derivato potenziato da una famiglia di antibiotici esistente;
ii. agenti antibatterici strutturalmente superiori (nuove strutture chimiche);
iii. identificare i vantaggi di classi alternative di agenti, compresi i fagi.

Un aspetto burocratico rilevante sono le certificazioni, che aumentano la complessità della pipeline di sviluppo di nuovi antibiotici, rendendo meno redditizio per le aziende farmaceutiche investire tempo e sforzi. La situazione attuale indica che è

necessario adottare con urgenza nuovi metodi per combattere la resistenza batterica. Uno degli approcci ampiamente discussi parla di nanotecnologia e dell'uso della "nanofunzionalizzazione" per ristabilire l'attività antimicrobica degli antibiotici esistenti. Un rapporto di Natan, M. e Banin, E. (2017) illustra come le nanotecnologie possano combattere gli MDR, introducendo nanoparticelle (NPs) in due categorie funzionali [7]. Queste due categorie comprendono le NP con proprietà antibatteriche intrinseche e quelle che veicolano agenti antibatterici. In quest'ultimo caso, l'azione antibatterica avviene attraverso il contatto diretto con l'agente patogeno in questione, rendendo così nulli alcuni meccanismi di resistenza antimicrobica. Un rapporto di van der Meij, A. et al. (2017) si è concentrato sulla produzione di antibiotici da parte degli attinomiceti [8]. È stato documentato che questi batteri filamentosi sopravvivono in simbiosi con altri organismi e offrono protezione e promozione della crescita. È stato suggerito che i gruppi di geni biosintetici siano espressi in risposta alla richiesta dell'ospite dovuta a diversi fattori ambientali. È stato documentato che questa intuizione è utile per la scoperta di farmaci.

Tracanna, V. et al. (2017), in un rapporto che discute la diversità delle funzioni dei composti antimicrobici procarioti, hanno evidenziato diverse strategie di estrazione, tra cui la sintesi ribosomiale e la modificazione post-traduzionale di peptidi, polichetidi, ecc. Queste strategie sono fondamentali per estrarre gruppi di geni biosintetici nuovi, per restringere il campo dei potenziali agenti antimicrobici. Un processo laborioso, che indica la necessità di combinare le informazioni sul genoma con i dati funzionali ed ecologici. Per garantire un uso ottimale dei genomi già ben sequenziati, sono stati sviluppati nuovi strumenti in grado di identificare e riutilizzare molecole antimicrobiche esistenti e nuove. Attualmente sono stati scoperti migliaia di cluster di geni con il potenziale di codificare delle biomolecole promettenti. Le informazioni ecologiche aiutano a stabilire le priorità delle funzioni antimicrobiche chiave. C'è anche un approccio di function mining basato sulla funzione prevista, che comprende

l'uso di informazioni sui domini proteici, per il genome mining, o sulla modalità d'azione. Un rapporto di Pachon-Ibanez, M.E. et al. (2017) ipotizza che le defensine possano essere agenti terapeutici antimicrobici [10]. Questa rassegna evidenzia i progressi nello sviluppo delle defensine umane e della catelicidina LL-37, insieme ai loro derivati, come potenziali agenti antimicrobici clinici. Oltre a discutere le modalità d'azione degli agenti e dei loro analoghi, lo studio evidenzia anche le azioni difensive mediate dall'ospite e i tre fattori chiave che impediscono l'uso diffuso di candidati promettenti: stabilità, tossicità e costo [10]. Le ricerche condotte nel corso degli anni hanno evidenziato le difficoltà insite negli agenti antimicrobici e la minaccia MDR, anche se la scienza continua ad accrescere la nostra comprensione oltre il livello cellulare. Tuttavia, per ottenere un successo clinico, è essenziale che gli sforzi e i fondi stanziati per la ricerca di base e applicata aumentino in modo significativo.

1.3 FATTORI CHE CONTRIBUISCONO ALLA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Nel corso della storia è stato documentato che lo sviluppo della resistenza agli antibiotici è un processo naturale per consentire la sopravvivenza dei batteri, ma è stato alimentato da attività umane come la prescrizione eccessiva e inappropriata, l'uso eccessivo di antibiotici come integratori per la crescita del bestiame e la disponibilità di pochi nuovi antibiotici [11]. Numerose pubblicazioni recenti hanno sottolineato le conseguenze della promozione della *stewardship* antimicrobica tra i medici per ridurre le complicazioni legate all'uso degli antibiotici. Questi programmi conferiscono alla comunità medica, anche a livello universitario, le conoscenze necessarie per gestire la crisi dell'antibiotico-resistenza, un aspetto critico della salute pubblica [12,13]. La Figura 2A,B (modificata dall'articolo del Dr. Razzaque) evidenzia le fasi fondamentali e gli aspetti chiave coinvolti nell'impatto positivo delle misure adottate contro l'AMR.

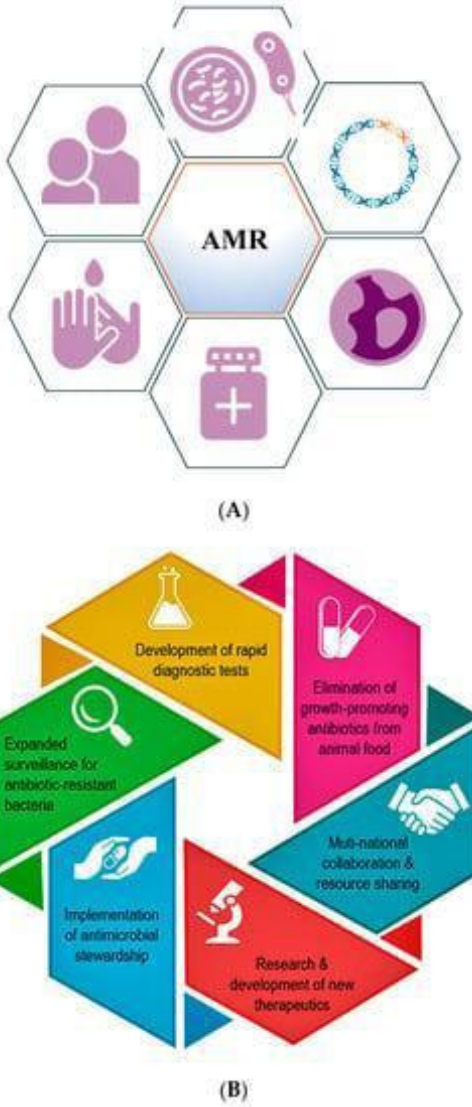


Figura 2. (**A**) *Diagramma che evidenzia le fasi principali da attuare per ridurre al minimo la resistenza antimicrobica.* (**B**) *Rappresentazione schematica degli aspetti chiave che possono avere un impatto positivo sulla lotta globale alla resistenza antimicrobica (modificata dal documento del Dr. Razzaque).*

- La resistenza agli antibiotici si verifica quando il microbo bersaglio sviluppa un meccanismo fisiologico per superare l'impatto del farmaco. Ciò può essere causato da una modifica della struttura o della composizione dell'involucro batterico, alla produzione di enzimi che decompongono l'agente bersaglio, ecc. Ci sono anche altri meccanismi come la limitazione dell'afflusso di farmaco e l'aumento dell'efflusso, o la modifica/inattivazione del bersaglio del farmaco [14]. Contribuiscono alla crisi dell'AMR, oltre al processo naturale di sviluppo della resistenza, le pratiche d'uso attuali che prevedono la prescrizione impropria di farmaci, compresi quelli ad ampio spettro [15].
- La resistenza antimicrobica, oltre ad aumentare la difficoltà di gestione delle malattie, ha anche un impatto sul paziente. È stato documentato che compromette il sistema immunitario umano e aumenta le complicazioni e la vulnerabilità dopo interventi chirurgici complicati che coinvolgono il cancro, la sostituzione del ginocchio, la dialisi, ecc. Inoltre, i soggetti con condizioni di comorbilità hanno un rischio maggiore di esiti avversi gravi con l'AMR. Le condizioni che richiedono l'uso di antibiotici "di ultima linea" aumentano anche in modo significativo i costi di trattamento per il cliente, prolungando i tempi di permanenza in ospedale e i tassi di ricovero [16,17].
- L'evidenza crescente che la pratica dell'uso degli antibiotici sia un grosso rischio per la resistenza antimicrobica rende necessarie delle pratiche di gestione clinica diffuse e adeguatamente guidate. La conoscenza delle vaccinazioni, della trasmissione e delle strategie di prevenzione è la chiave dell'educazione alla salute pubblica. Elaborare delle pratiche di cura delle ferite e delle infezioni tra i pazienti con condizioni di comorbilità può ridurre l'onere del ricovero ospedaliero e controllare la diffusione delle infezioni.
- Anche la comunicazione della necessità di antibiotici sulla base della diagnosi e del protocollo di gestione clinica raccomandato è un aspetto molto importante dell'AMR.

La mancanza di strumenti diagnostici e di linee guida normative e l'auto-trattamento con antibiotici da banco per disturbi come il raffreddore e l'influenza sono comuni nei Paesi in via di sviluppo e contribuiscono pesantemente all'AMR [18]. Per evitare l'abuso dell'uso di antibiotici è anche necessario ridurre o controllare gli incentivi finanziari per la prescrizione di antibiotici da parte dei medici attraverso le aziende farmaceutiche [19].

- Oltre ai cambiamenti nell'uso e nei modelli di consumo di antibatterici nelle diverse economie globali, i viaggi moderni hanno contribuito in modo determinante alla diffusione di nuove infezioni e della resistenza agli antibiotici in tutto il mondo. La recente pandemia da coronavirus (COVID-19) ne è il miglior esempio. Uno studio documentato tra i viaggiatori europei provenienti dall'India ha identificato la presenza di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (CPE), anche tra coloro che non hanno avuto contatti con il sistema sanitario indiano durante il loro soggiorno [20,21].

1.4 FATTORI CHE CONTRIBUISCONO ALLA TRASMISSIONE DELL'AMR

È stato documentato che la trasmissione di microbi altamente resistenti ai farmaci avviene tra le specie e all'interno di esse. L'identificazione dei serbatoi e delle migliori pratiche relative alle cause di trasmissione sarà fondamentale per controllare le future pandemie.

Le pandemie e le epidemie di COVID-19 sono esempi di virus che diffondono materiale tra le specie. Qualsiasi misura di sanità pubblica in grado di controllare la diffusione e l'uso di agenti antibatterici è il primo passo per controllare la resistenza antimicrobica.

Sono necessari dei sistemi di sorveglianza globale di alta qualità per informare sui cambiamenti nell'uso degli antimicrobici,

e bisogna evitare lo sfasamento temporale nella trasmissione delle conoscenze: questo è un modo per prevenire una crisi sanitaria globale da AMR.

1.5 AZIONI PER COMBATTERE LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Lo sviluppo della resistenza agli antibiotici è un processo graduale in cui i microbi coinvolti sviluppano capacità di resistenza contro gli agenti che li dovrebbero distruggere. Per affrontare questa minaccia è necessaria un'azione aggressiva per:

- Prevenire le infezioni e controllare la trasmissione;
- Migliorare l'uso degli antibiotici per rallentare lo sviluppo della resistenza attraverso una sorveglianza di alta qualità e linee guida sull'uso;
- Bloccare la diffusione di microbi resistenti quando si sviluppano attraverso programmi di gestione antimicrobica.

1.6 INTERAZIONI MICROBIOMA-ANTIBIOTICO

La scienza del microbioma intestinale ha offerto opportunità sempre più ampie per studiare l'interazione uomo-microbioma e fornire un ecosistema per valutare le interazioni microbioma-antibiotico. L'impatto degli antibiotici sul microbioma dell'intestino umano continua a essere un argomento degno di interesse. L'esposizione agli antibiotici nella prima infanzia è stata collegata a impatti immunologici, neurologici e gastrointestinali; l'uso di antibiotici a qualsiasi età è stato collegato a impatti negativi sulla microflora intestinale, che portano all'emergere di diarrea resistente agli antibiotici [22].

Oltre alla resistenza antimicrobica, alcuni studi hanno evidenziato l'impatto degli antibiotici sulle malattie, tra cui obesità, cancro e malattie infiammatorie intestinali [23]. Ciò riba-

disce la necessità di controllare l'uso degli antibiotici anche a prescindere dalla crisi dell'AMR. Per limitare l'effetto degli antibiotici sul microbiota intestinale, è stato suggerito di istituire un programma di stewardship antimicrobica e di curare la disbiosi attraverso prebiotici, probiotici e trapianto di microbiota fecale [24]. I fattori che determinano l'aumento dei geni di resistenza agli antibiotici (ARG [*Antibiotic Resistance Genes*]) possono essere valutati anche attraverso il microbiota intestinale. Alcuni studi hanno documentato che il microbiota intestinale è una ricca riserva di resistenza agli antibiotici (AR) che contribuisce all'emergere della resistenza ai farmaci multipli attraverso il trasferimento genico orizzontale (HGT [*Horizontal Gene Transfer*]), innescato anche durante l'uso di antibiotici come profilassi importantissima [25].

La deplezione del microbioma indotta dagli antibiotici è un fenomeno ben documentato dovuto alla terapia antibiotica ed è implicato nell'alterazione dell'omeostasi metabolica attraverso la segnalazione intestinale [26]. Gli studi hanno anche documentato che i metaboliti della microflora intestinale sono fondamentali per l'asse intestino-cervello, compresi gli acidi grassi a catena corta, i metaboliti degli acidi biliari, ecc. Le alterazioni delle vie microbico-metaboliche sono state collegate alla malattia di Alzheimer, all'ansia, alla depressione, ecc. [27].

Alcuni studi hanno anche documentato l'impatto della somministrazione di antibiotici ad ampio spettro a persone sane dopo la vaccinazione contro l'influenza stagionale sulla microflora intestinale. L'analisi ha rilevato un aumento delle firme infiammatorie e una riduzione degli acidi biliari che causano l'attivazione dell'inflammasoma [28]. Il trapianto autologo di microbiota fecale (a-FMT) è stato ampiamente studiato come intervento per trattare la disbiosi causata da malattie infettive come l'infezione *da Clostridioides difficile* (CDI), con cui sono stati registrati tassi di guarigione fino al 90%.

Altre condizioni includono le malattie infiammatorie intestinali, la cui efficacia clinica varia tra il 25 e il 50%. Le differenze

nell'impatto dell'FMT sono state attribuite anche alle differenze nella composizione del microbioma tra donatori e riceventi, dovute a cambiamenti nella dieta e nell'ambiente in momenti diversi [29,30].

La maggior parte dei farmaci somministrati per via orale viene esposta ai commensali intestinali dell'ospite e la microflora umana ha dimostrato di rispondere attraverso gli enzimi di metabolizzazione dei farmaci. È stato dimostrato che la microflora intestinale agisce in sinergia con l'ospite per mantenere l'omeostasi intestinale, metabolizzando xenobiotici e farmaci attraverso l'alterazione dei livelli di espressione dei recettori di trasporto dei farmaci e degli enzimi di metabolizzazione dei farmaci [31].

È stato dimostrato che la microflora intestinale influisce anche sulla biodisponibilità delle sostanze fitochimiche, compresi gli intermedi metabolici come le glicosidasi e le demetilazioni [32]. Inoltre, il metabolismo della curcumina è stato associato all'*Escherichia coli* [33].

Il microbiota intestinale è anche coinvolto nell'attivazione e nella disattivazione di farmaci come la sulfalazina, la digossina, l'irinotecan, il cloramfenicolo e le nitrobenzodiazepine, per citarne alcuni [34,35,36,37]. Uno studio recente ha valutato l'impatto di settantasei diversi batteri intestinali umani sul metabolismo di duecentosettantuno farmaci orali utilizzando il sequenziamento high-throughput con spettrometria di massa. Lo studio ha rilevato che 176 farmaci sono stati metabolizzati in modo significativo da almeno un ceppo batterico e che ogni ceppo ha metabolizzato da 11 a 95 farmaci diversi [38].

Questi progressi evidenziano la possibilità di progettare farmaci personalizzati che possano agire in combinazione con le pratiche esistenti di farmacogenomica. La Figura 3 evidenzia che la resistenza antimicrobica è la causa del maggior carico di malattia, come sottolineato nella revisione sulla resistenza antimicrobica di Jim O'Neill [39].

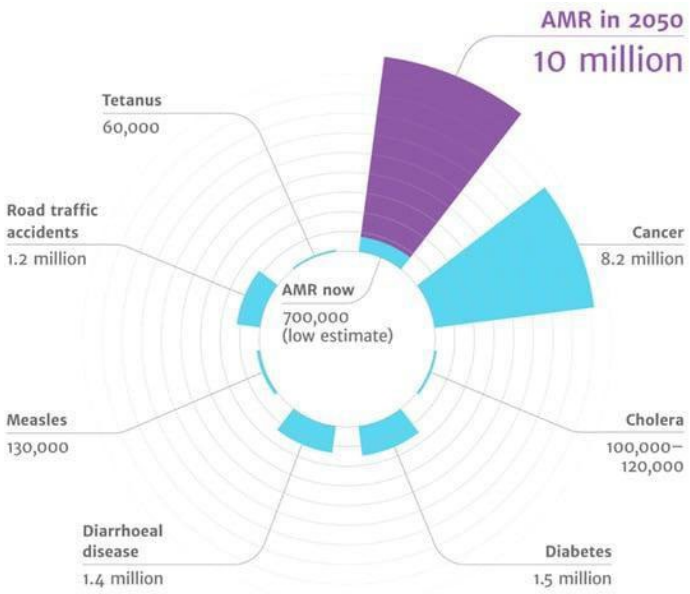


Figura 3. *La resistenza antimicrobica ha il più alto carico di malattia (fonte: la revisione sulla resistenza antimicrobica presieduta da Jim O'Neill).*

1.7 APPLICAZIONI DELLA TECNOLOGIA CONTRO LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Alcuni studi hanno descritto l'antibiotico-resistenza come dinamica, il che implica l'importanza di tecnologie all'avanguardia per studiare la diversità microbica [40]. Le piattaforme emergenti, come la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGS), gli strumenti bioinformatici e i database pubblici dinamici su larga scala, hanno accelerato la ricerca sulla resistenza agli antibiotici. I progressi tecnologici integrano una profonda comprensione meccanicistica della resistenza agli antibiotici con un'analisi genomica ad alta profondità, contribuendo a migliorare la sorveglianza e a sviluppare strategie proattive per mitigare le minacce [41].

La metagenomica è l'approccio attualmente più utilizzato per studiare il resistoma. Tre metodi, tra cui la metagenomica shotgun, la metagenomica funzionale e il sequenziamento genico mirato, sono stati adottati e raccomandati da diversi studi nell'ultimo decennio.

Gli studi hanno caratterizzato il resistoma intestinale pediatrico usando librerie metagenomiche ricombinanti, che hanno portato all'identificazione della resistenza a 14 dei 18 antibiotici testati, appartenenti a otto classi di farmaci. Inoltre, alcuni dei geni recuperati includevano diidrofolato reduttasi resistenti ai farmaci, acetiltransferasi del cloramfenicolo, pompe di efflusso multifarmaco e tutte le principali classi di beta-lattamasi. Anche molte sequenze che causano resistenza sono risultate mobilizzabili [42].

La metagenomica funzionale con frammenti di acido deossiribonucleico (DNA) clonati a tappeto è stata sempre più utilizzata per identificare e caratterizzare i serbatoi di resistenza agli antibiotici [43]. Questi studi evidenziano l'importanza di utilizzare piattaforme di sequenziamento ad alte prestazioni, database ARG appropriati e pipeline di analisi per identificare l'AMR a livello di resistoma. Anche il sistema SmartChip (Takara, Shiga, Giappone), che è un array quantitativo di reazione a catena della polimerasi ad alto rendimento, è stato ampiamente utilizzato per studi sul resistoma che coinvolgono vari microbiomi ambientali [44,45,46].

Questo sistema presenta una serie di vantaggi, tra cui la capacità di analizzare un elevato numero di ARG in parallelo in tempi brevi, e ha una maggiore sensibilità rispetto all'approccio metagenomico per l'individuazione delle ARG. Per l'analisi del resistoma, il sequenziamento dell'intero genoma per l'identificazione dei determinanti della resistenza antimicrobica è preferito per la fattibilità tecnica, l'efficacia dei costi e la capacità di identificare risultati perseguibili in riferimento al controllo delle infezioni [47].

1.8 SORVEGLIANZA DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA ATTRAVERSO IL SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS)

La preoccupazione per la crescente incidenza di casi di resistenza multi-farmaco è in aumento e quindi la sorveglianza e la comprensione degli ARG sono fondamentali per monitorarne l'emergere e la diffusione. Gli ARG si trovano in diversi contesti, tra cui:

1. Microarray [48,49].
2. Reazione a catena della polimerasi (PCR) [50].
3. Sequenziamento dell'intero genoma (WGS) [51].
4. Metagenomica [52].

1.9 APPROCCI DI SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA PER LA SORVEGLIANZA DELLA RESISTENZA

I progressi della genomica per l'individuazione della resistenza agli antibiotici non sono stati implementati con successo nei laboratori clinici, dove sono ancora in uso i tradizionali metodi di diluizione e diffusione in serie [53]. Però queste tecniche si sono rivelate promettenti per la progettazione di terapie antinfettive. Per la sorveglianza degli ARG, le tecniche tradizionali presentano diversi svantaggi. Tra questi, la mancanza di un approccio validato e sensibile per diversi microbi, le condizioni interlaboratorio e il numero limitato di farmaci testati. La sorveglianza degli ARG è inoltre inefficace se non include un confronto dei genotipi tra più ospiti e zone ambientali, consentendo di tracciare il percorso e il grado di diffusione [54,55].

La firma genetica determinata mediante WGS mostra informazioni molto precise, grazie alle quali è possibile identificare microbi, stabilire relazioni filogenetiche, individuare mutazioni, migliorare l'identificazione di nuovi geni putativi e prevedere la suscettibilità fenotipica agli antibiotici. L'analisi del genoma può anche fornire preziose informazioni sui tratti di resistenza agli

antibiotici. Ciò è prezioso per le indagini sui focolai e per la sorveglianza e la diffusione in tempo reale degli ARG [53]. La sorveglianza degli ARG in tempo reale contribuisce all'identificazione precoce dei focolai e all'aggiornamento delle politiche di sanità pubblica. Uno studio del Consiglio sanitario del Golfo ribadisce la necessità di una sorveglianza della resistenza antimicrobica basata sul WGS per identificare l'impatto e la prevalenza [56]. Il WGS è stata una tecnologia scelta in molti casi di rintracciamento delle fonti dei focolai e definizione di procedure di segnalazione degli alimenti contaminati. Il WGS offre anche diversi altri vantaggi rispetto alle piattaforme tradizionali di analisi della resistenza, tra cui l'individuazione dell'esistenza di una co-resistenza ad altri agenti antibiotici, come le farine pesanti, e le previsioni sull'identificazione del trasferimento genico orizzontale [53]. Sebbene il WGS sia uno strumento potente per la sorveglianza degli ARG, i requisiti relativi agli standard di purezza delle colture aumentano la complessità tecnica. È anche dimostrata l'assenza dell'aspetto della "coltivabilità" della maggior parte dei taxa batterici e di *Archaea* [57].

La sorveglianza degli ARG è una parte essenziale del Sistema globale di sorveglianza della resistenza antimicrobica lanciato dall'OMS nel 2015 come primo sforzo collaborativo per standardizzare la sorveglianza della resistenza antimicrobica. Fornisce un quadro strutturale per raccogliere, analizzare e condividere i dati sulla resistenza antimicrobica e documenta lo stato della sorveglianza della resistenza antimicrobica, che avvenga con sistemi esistenti o nuovi. Incoraggia il passaggio da un sistema di dati basati sugli isolati a dati a livello epidemiologico e clinico. L'obiettivo è quello di generare dati standardizzati e comparabili tra le nazioni, di rappresentare una linea guida per la definizione delle politiche, di tracciare la diffusione e l'emergere degli ARG e di guidare l'allocazione delle risorse per gestire le minacce ARG [58,59]. Il sistema di sorveglianza integrata della resistenza antimicrobica si è adattato ai requisiti e alle minacce in continua evoluzione, attraverso l'ampliamento della sorveglianza dei bacini di utenza, lo studio di nuove fonti di isolamento, l'elaborazione di schemi di campiona-

mento e la modifica degli agenti antimicrobici testati [55]. L'iniziativa del Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie, nell'UE, esiste da tempo per l'indagine e il monitoraggio dei focolai [5]. Ciò ribadisce la necessità di istituire degli organismi di monitoraggio simili in tutto il mondo, tra cui il GHC per la sorveglianza delle ARG e il monitoraggio e l'indagine dei focolai in Arabia Saudita. Sono state proposte diverse misure per affrontare le sfide poste dalla resistenza agli antibiotici e per superare questa crisi, tra cui l'educazione del pubblico e le misure politiche, che sono efficaci quando sono in grado di aggiornarsi nel tempo, ma combattere l'abuso di antibiotici a livello internazionale è ancora fondamentale [47].

Una revisione sulla resistenza antimicrobica del 2016 evidenzia che l'inazione nei confronti della resistenza antimicrobica potrebbe portare a una perdita di produttività globale dell'ordine di 100.000 miliardi di dollari entro il 2050. Inoltre, poche iniziative governative nel mondo occidentale hanno finanziato la ricerca in questo senso, tra cui il Fleming Fund del governo britannico, avviato per migliorare la sorveglianza sulle infezioni resistenti ai farmaci nei Paesi a basso e medio reddito. Il report evidenzia anche la disparità degli investimenti nella ricerca antimicrobica, che sono stati solo 1,8 miliardi di dollari dei 38 miliardi di dollari investiti (<5%) dai fondi di capitale di rischio in Ricerca e Sviluppo tra il 2003 e il 2013 [60].

1.10 APPROCCI METAGENOMICI PER LA SORVEGLIANZA DELLA RESISTENZA

La metagenomica è documentata come il miglior progresso tecnologico per l'identificazione dell'intero spettro di AMR da varie fonti, compresa la microflora intestinale del bestiame e dell'uomo. La metagenomica descrittiva svolge un ruolo chiave nell'identificare la struttura della comunità del microbioma e le variazioni dell'abbondanza microbica in diverse condizioni ambientali e fisiologiche. La metagenomica funzionale studia le

interazioni ospite-microbo e microbo-microbo in un ecosistema dinamico predittivo [61,62]. È stato documentato che la metagenomica è un'aggiunta nuova e importante alla tassonomia molecolare, in quanto ha stabilito un metodo di tipizzazione standard che supera gli ostacoli imposti dai metodi classici di coltura; inoltre, è guidata solo dalla sequenza e dalla funzione [63]. Si sono attribuite all'analisi metagenomica strutturale la scoperta di nuovi meccanismi di AMR e l'identificazione di serbatoi di ARG. La metagenomica funzionale ha invece promesso delle soluzioni alla resistenza antimicrobica per la scoperta di nuovi antibiotici, proteine antibatteriche e vie di sintesi degli antibiotici [64]. La Figura 4 evidenzia come la sorveglianza possa migliorare i risultati sanitari, secondo l'OMS.

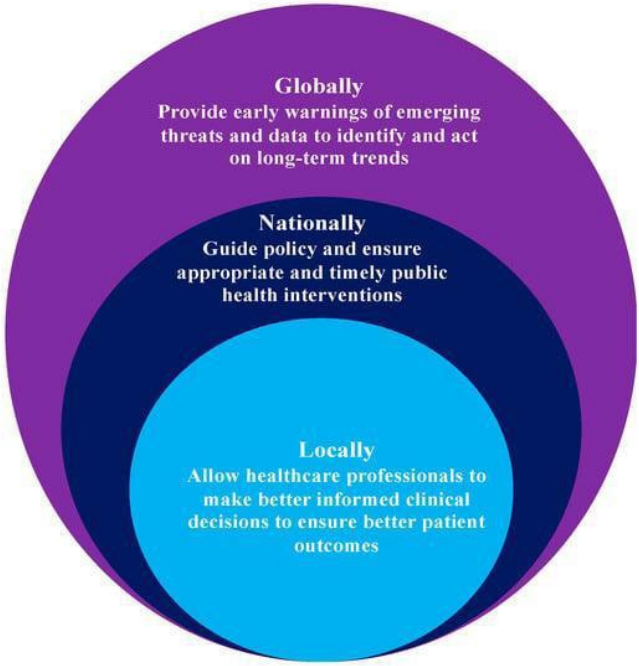


Figura 4. *Come la sorveglianza può migliorare i risultati sanitari.*

1.10.1 IDENTIFICAZIONE DELLE CARATTERISTICHE GENOMICHE DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA DAI DATI WGS

L'approccio fondamentale per identificare la presenza di ARG prevede lo studio dei dati di sequenziamento dell'intero genoma, sia per gli elementi endogeni che per i plasmidi. I dati sulla presenza/assenza e sull'abbondanza dei vettori sono stati utilizzati per lo sviluppo di modelli di apprendimento automatico per prevedere la presenza di AMR nei campioni. C'è un report sulla previsione della resistenza antimicrobica mediante WGS in *Staphylococcus aureus* che ha coinvolto l'assemblaggio dei genomi con l'algoritmo BLASTn [65]. Un'altra relazione su uno strumento web basato su WGS, denominato PointFinder, ha identificato mutazioni puntiformi in patogeni batterici che sono causa di AMR attraverso un database e studi che hanno utilizzato BLASTn per identificare i geni nel database e sono stati ulteriormente analizzati i risultati con identità >/= 80% [66]. PhyResSE è stato utilizzato per delineare la resistenza agli antibiotici e il lignaggio di *Mycobacterium tuberculosis* attraverso i dati WGS. Si tratta di dati di resistenza convalidati provenienti da campioni ben caratterizzati di tutto il mondo ed è stato creato su misura per la diagnosi della resistenza agli antibiotici di MTBC [67]. Lo strumento applica BWA-MEM per mappare gli isolati con i riferimenti in modo più rapido rispetto all'allineatore di sequenze BLASTn per identificare il lignaggio dell'isolato da un catalogo precompilato di 92 lignaggi con fenotipi di resistenza noti [68]. Il "Mykrobe predictor" utilizza un approccio privo di allineamento attraverso i grafi di de Bruijn per costruire una libreria di ceppi di riferimento di *M. tuberculosis* e *S. aureus* resistenti e suscettibili a più antibiotici. Può identificare le specie, costruire profili di resistenza e analizzare altri aspetti, come i lignaggi filogenetici e gli elementi di virulenza. L'impatto della ricerca estesa che utilizza i dati WGS ha portato alla pubblicazione del rapporto del consorzio CRyPTIC su oltre 10.000 isolati clinici di *M. tuberculosis* provenienti da 16 Paesi, in rappresentanza di tutti i principali lignaggi, e ha concluso che il WGS è efficiente per caratterizzare

i profili di suscettibilità agli agenti antitubercolari di prima linea, con un'accuratezza sufficiente per l'uso clinico [The CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project]. Sebbene il pannello sia spesso predefinito per un insieme di ARG, l'elevata confidenza della previsione lo rende adatto all'uso clinico.

1.10.2 FIRME GENICHE AMR DAI DATI DI ESPRESSIONE

Un altro approccio alla previsione della resistenza antimicrobica è rappresentato dalle differenze nell'espressione genica dell'isolato dopo l'esposizione al farmaco target. Un rapporto di Suzuki S et al. [69] descrive dettagliatamente i cambiamenti genotipici e fenotipici nei ceppi batterici resistenti agli antibiotici, come l'*E. coli*. Questo studio ha rilevato che l'acquisizione della resistenza a un farmaco modifica la suscettibilità e la resistenza ad altri. La successiva analisi dell'espressione genica ha portato all'identificazione di meccanismi dinamici di compensazione. La teixobactina, un nuovo agente antimicrobico, ha documentato un'attività contro *S. aureus* ed *Enterococcus faecalis* senza resistenza. Uno studio che ha riportato la risposta trascrizionale di *E. faecalis* ai livelli di teixobactina ha identificato lo sviluppo di una tolleranza intrinseca ad alte concentrazioni della stessa (attraverso la delezione di *croRS*), e generalmente questo è considerato un precursore per lo sviluppo della resistenza [70]. Oltre ai meccanismi noti, che coinvolgono l'espressione differenziale dei geni bersaglio degli antibiotici e i trasportatori di efflusso degli xenobiotici, gli studi emergenti hanno il potenziale per rivelare circuiti regolatori che rispondono a diversi stimoli tossici e altri meccanismi di compensazione. Tra i principali ostacoli all'implementazione clinica, tuttavia, abbiamo la complessità sperimentale e il tempo necessario per analizzare e interpretare i dati. Inoltre, la mancanza di annotazione di tutti i patogeni clinicamente importanti (e dei loro ceppi), come l'*E. coli*, e l'identificazione dei trascritti espressi in modo differenziato sono ulteriormente ritardate dalla necessità di annotazione funzionale per decifrare il loro ruolo nell'AMR.

1.10.3 INDIVIDUAZIONE DI MECCANISMI DI RESISTENZA ANTIMICROBICA INDIPENDENTI DALL'ARG

Questo approccio consente di chiarire i meccanismi della resistenza antimicrobica sulla base di confronti genomici globali con vari profili di suscettibilità di più ceppi. Un altro studio proof-of-concept ha registrato l'importanza della selezione di stabilità per indagare la relazione genotipo-fenotipo batterico in *M. tuberculosis* e *S. aureus* come approccio valido. Questo studio ha evidenziato l'importanza della genotipizzazione con *k-mers*, i cui vantaggi includono l'assenza di allineamenti e la capacità di identificare diverse categorie di varianti genetiche, tra cui inserzioni e delezioni di singoli nucleotidi nelle regioni codificanti e non codificanti. Lo studio ha identificato i *k-mers* (*n* = da 1 a 8 per anticorpo; 22 in totale), che sono stati ulteriormente utilizzati nei modelli di regressione lineare per ciascun anticorpo testato e hanno dimostrato di avere prestazioni pari a quelle di Mykrobe [71].

Gli studi hanno evidenziato l'importanza dell'apprendimento automatico con l'analisi strutturale del pan-genoma di *M. Tuberculosis* per identificare le firme genetiche della resistenza agli antibiotici. La successiva mappatura con le strutture 3D disponibili di alcune proteine selezionate associate alla resistenza agli antibiotici ha permesso agli autori di individuare i cluster di mutazioni di alcune proteine, in risposta agli antibiotici. Questa intuizione può aiutare a spiegare meglio la causalità degli alleli AMR [72]. Un'altra recente relazione ha esplorato le prestazioni di due modelli basati sull'apprendimento, gli alberi di classificazione e di regressione, per la previsione dell'AMR. Lo studio ha rilevato che si tratta di modelli altamente accurati e l'interpretazione ha rivelato meccanismi di resistenza noti per 12 specie e 56 antibiotici e potenzialmente nuovi [73].

L'approccio pan-genomico è ad alta intensità di finanziamenti, in quanto richiede tecnologie di sequenziamento genomico e strumenti per un approccio di confronto a livello di genoma, sebbene sia molto promettente per le applicazioni cliniche. Un vantaggio è la capacità di esplorare interi genomi invece di re-

gioni note legate alla resistenza antimicrobica, per identificare nuovi meccanismi o elementi regolatori. Questo è fondamentale per determinare se la relazione tra una firma genomica e l'AMR è una probabilità statistica o un rapporto causale. Inoltre, disporre di ampie collezioni di ceppi è fondamentale per ottenere informazioni sulla resistenza antimicrobica, il che rende la sfida più difficile.

1.10.4 DECIFRARE IL MECCANISMO DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA DAI DATI METABOLOMICI

Anche lo studio del profilo metabolico è stato ampiamente studiato come approccio altrettanto valido. Un rapporto di Yang JH et al. [74] ha discusso la modellazione di rete integrata di screening biochimico "white-box" e l'approccio di apprendimento automatico per identificare i meccanismi causali e applicarli alla comprensione dell'efficacia degli antibiotici. Lo studio ha effettuato un contro-screening di tre antibiotici (ampicillina, ciprofloxacina e gentamicina) contro *E. coli* e ha simulato lo stato metabolico corrispondente mediante un modello di rete metabolica su scala genomica. L'approccio di apprendimento automatico white-box ha fornito informazioni sui meccanismi delle vie, facilitando la quantificazione dei contributi relativi di ciascuna via metabolica per affrontare i meccanismi letali di ciascun antibiotico. Inoltre, il profilo di oltre 500 metaboliti putativi intracellulari ed extracellulari delle 190 popolazioni evolute ha evidenziato il metabolismo del carbonio e dell'energia per limitare la velocità e la modalità di acquisizione della resistenza. Lo studio ha inoltre identificato molteplici meccanismi impiegati dal ceppo *di E. coli* per compensare la pressione esercitata dai diversi antibiotici, tra cui mutazioni o espressione di pompe di efflusso, che si è scoperto essere influenzate dalla fonte di carbonio e quindi dallo stato metabolico in cui si trova l'organismo [75]. Questo approccio evidenzia una prospettiva evoluta nella comprensione dell'azione antibiotica e della risposta dei batteri ai farmaci.

1.11 CONCLUSIONI

La resistenza agli antibiotici è una parte inevitabile dell'evoluzione microbica. Ciò sottolinea la necessità di sorvegliare gli ARG come aspetto fondamentale per la definizione delle politiche future. La WGS e la metagenomica, insieme a potenti strumenti bioinformatici e banche dati, hanno solo approfondito le nostre conoscenze in merito. L'affidabilità dei risultati di queste tecniche incoraggia la loro applicazione nella diagnostica di routine. L'uso di antibiotici porta alla disbiosi del microbioma intestinale, cosa che causa diversi effetti collaterali. Nel monitoraggio della resistenza antimicrobica in generale e nell'implementazione delle tecnologie NGS in particolare, ogni ambito presenta una propria serie di requisiti, realtà e sfide tecniche. L'unica strada percorribile è la formazione continua, la sorveglianza, l'analisi dei dati e la ricerca per affrontare questa crisi della resistenza antimicrobica. Alcune soluzioni discusse per l'AMR sono: una campagna di sensibilizzazione pubblica globale che affronti il problema dell'offerta; il controllo dell'uso degli antibiotici; lo stimolo per avviare test diagnostici più rapidi.

L'approccio bioinformatico all'identificazione della resistenza antimicrobica comprende aspetti che si concentrano su approfondimenti affidabili della resistenza antimicrobica, replicabili in ambito clinico. L'obiettivo è quello di evidenziare nuovi geni di resistenza, i meccanismi di regolazione o nuovi bersagli antibiotici. Ogni approccio ha dei limiti che devono essere presi in considerazione quando si costruiscono e si addestrano modelli di previsione superiori. La combinazione di tecnologie molecolari avanzate e di potenti algoritmi di intelligenza artificiale e di apprendimento automatico è molto promettente per la comprensione della resistenza antimicrobica a livello molecolare e per la generazione di previsioni clinicamente rilevanti, che portino alla selezione di antibiotici personalizzati orientati a risultati clinici favorevoli.

2 - RESISTENZA BATTERICA AGLI AGENTI ANTIMICROBICI

Tratto e tradotto da
Varela M.F., Stephen J., Lekshmi M., Ojha M., Wenzel N., Sanford L.M., Hernandez A.J., Parvathi A., Kumar S.H., *Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents*. Antibiotics 2021, 10, 593.

https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593

Abstract
I patogeni batterici che sono causa di infezioni costituiscono una grande preoccupazione nel settore della sanità pubblica. In particolare, i batteri con resistenza a più agenti antimicrobici possono compromettere l'efficacia chemioterapica delle malattie infettive. I batteri multifarmaco-resistenti ospitano vari meccanismi molecolari e cellulari di resistenza antimicrobica. Questi meccanismi di resistenza antimicrobica comprendono l'efflusso attivo di antimicrobici, la riduzione dell'ingresso dei farmaci nelle cellule dei patogeni, il metabolismo enzimatico degli agenti antimicrobici in prodotti inattivi, la formazione di biofilm, l'alterazione dei bersagli dei farmaci e la protezione dei bersagli antimicrobici. Questi sistemi microbici rappresentano un punto di riferimento per le indagini volte a stabilire i mezzi per aggirarli e ristabilire l'efficacia terapeutica. Questa rassegna riassume brevemente i vari meccanismi di resistenza antimicrobica presentati dai batteri infettivi.

2.1 INTRODUZIONE

I batteri come patogeni microbici sono agenti causali di malattie infettive potenzialmente letali [1]. Tali batteri patogeni producono numeri allarmanti in termini di morbilità e mortalità [2,3]. Una conseguenza grave della patogenesi batterica vede la riduzione degli effetti terapeutici della chemioterapia antibatterica [4,5]. Nel corso della loro storia evolutiva, i patogeni batterici

hanno sviluppato vari mezzi per resistere alle conseguenze inibitorie e battericide degli agenti antimicrobici [4]. Tali sistemi di resistenza antimicrobica comportano l'impiego di sistemi molecolari e cellulari nei batteri [6]. È interessante notare che la selezione di una variante batterica con resistenza a un singolo agente antimicrobico manifesta spesso l'emergere di una resistenza multifarmaco nel nuovo mutante [7]. I nuovi patogeni con resistenza a più agenti antibatterici possono compromettere l'efficacia del trattamento delle infezioni [3,8].

I meccanismi di resistenza antimicrobica comprendono i sistemi di esportazione attiva all'interno delle membrane dei batteri, la prevenzione dell'ingresso degli antimicrobici nelle cellule dei batteri patogeni, la distruzione enzimatica degli agenti antimicrobici, la produzione di biofilm spessi, la modifica dei bersagli degli antimicrobici e la protezione dei siti d'azione batterici da parte degli antimicrobici (Figura 1) [2,4]. Inoltre, i batteri multifarmaco-resistenti hanno sviluppato meccanismi che consentono di trasferire il DNA e con esso i determinanti genetici della resistenza alle specie patogene in ambito clinico, nell'industria alimentare, nell'intestino umano e in agricoltura [9].

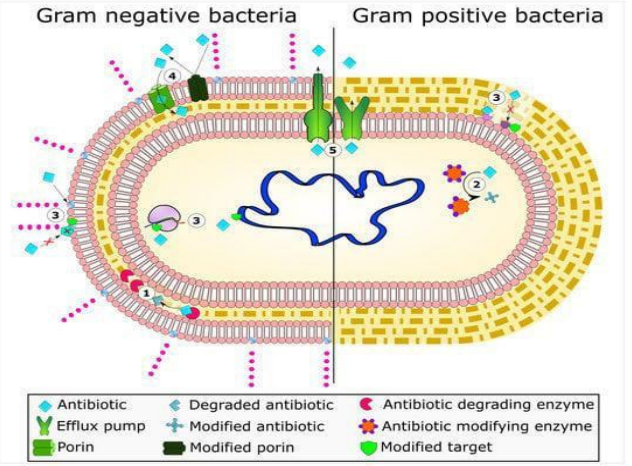


Figura 1. *Meccanismi batterici di resistenza agli agenti antimicrobici. I meccanismi comuni di resistenza agli antibiotici nei batteri sono l'idrolisi enzimatica* (**1**)*, le modifiche*

enzimatiche degli antibiotici mediante traslocazione di gruppo e reazioni redox (**2**)*, le modifiche dei bersagli degli antibiotici* (**3**)*, la ridotta permeabilità agli antibiotici mediante modifiche delle porine* (**4**) *e l'estrusione attiva degli antibiotici mediante pompe di efflusso di membrana* (**5**)*.*

Pertanto, sono auspicate nuove strategie per aggirare la resistenza che i batteri sviluppano per gli agenti antimicrobici [10]. Per scoprire nuovi approcci alle resistenze antimicrobiche multiple in questi patogeni microbici, tuttavia, è necessario raggiungere una chiara comprensione di questi sistemi di resistenza a livello molecolare e cellulare. Per i giovani e i nuovi ricercatori, consideriamo qui una panoramica introduttiva di ciascuno di questi meccanismi di resistenza batterica.

2.2 SISTEMI DI INATTIVAZIONE ANTIMICROBICA A BASE DI ENZIMI

Da quando si sono iniziati a usare gli antibiotici, sono stati scoperti anche diversi meccanismi enzimatici che li inattivavano. Sebbene negli ultimi tempi siano stati riportati pochi nuovi meccanismi di resistenza agli antibiotici, sono emerse diverse nuove varianti di enzimi noti che conferiscono ai batteri una resistenza ai farmaci di recente introduzione, suggerendo che la risposta batterica ai nuovi antibiotici o alle versioni modificate di quelli esistenti è rapida. Tra i meccanismi enzimatici della resistenza agli antibiotici abbiamo l'idrolisi, il trasferimento di gruppo e le reazioni redox [4]. In termini di diversità, evoluzione e diffusione, gli enzimi di resistenza agli antibiotici contribuiscono notevolmente alla capacità batterica di superare la pressione antibiotica. Le β-lattamasi sono gli enzimi di degradazione degli antibiotici più antichi e più diversificati che scindono l'anello β-lattamico degli antibiotici del gruppo delle penicilline e li rendono inefficaci. La prima β-lattamasi di questo tipo è stata scoperta poco dopo l'uso clinico del primo antibiotico, la penicillina. Le prove scientifiche suggeriscono l'esistenza di β-lattamasi prima che la penicillina fosse impiegata clinicamente, il che sottolinea che la produzione

di composti antimicrobici e i meccanismi per contrastarli avvengono in parallelo nell'ambiente [11]. I batteri che producono antibiotici richiedono apparentemente meccanismi per superare gli effetti letali dei composti, sotto forma di produzione concomitante di enzimi degradativi, mutazioni nei bersagli degli antibiotici o estrusione attiva degli antibiotici dalla cellula in modo da proteggere la cellula produttrice di antibiotici. Tuttavia, la pressione di selezione creata dall'uso estensivo di antibiotici nell'uomo e negli animali ha propagato cloni di batteri resistenti negli ambienti clinici e nell'industria alimentare. A tempo debito, i meccanismi di scambio genetico hanno facilitato una più ampia diffusione dei tratti di resistenza nelle comunità batteriche. L'introduzione di un maggior numero di antibiotici, sia nuovi che modificati, ha aumentato il processo di evoluzione e diffusione dei meccanismi di resistenza. Poiché la maggior parte degli antibiotici introdotti negli ultimi due decenni sono per lo più versioni modificate di antibiotici esistenti appartenenti alle stesse classi (per esempio, i β-lattamici), sono poche le mutazioni enzimatiche che possono rendervi i batteri rapidamente resistenti [11].

I β-lattami costituiscono il gruppo più numeroso di antibiotici utilizzati clinicamente, che comprende penicilline, cefalosporine di diverse generazioni, monobattami e carbapenemi, tutti caratterizzati dalla presenza di un anello β-lattamico a 3 carboni e 1 azoto. Gli antibiotici β-lattamici inibiscono le proteine batteriche note come penicillin-binding proteins (PBPs), che svolgono il ruolo critico di reticolazione dei peptidi durante la biosintesi della parete cellulare del peptidoglicano. Il mimetismo strutturale del frammento terminale d-Ala-d-Ala del peptide di reticolazione da parte dei β-lattami facilita l'inibizione competitiva delle PBP [12], che interrompe la sintesi della parete cellulare portando alla lisi e alla morte della cellula batterica [13]. Tuttavia, i batteri acquisiscono resistenza agli antibiotici lattamici modificando le loro PBP, che non sono più sensibili al legame con l'antibiotico. In alternativa, i batteri producono potenti lattamasi che degradano gli antibiotici prima che possano legarsi alle PBP. Dalla loro scoperta nei primi anni '40, la famiglia delle β-lattamasi è

cresciuta costantemente, con l'identificazione a livello globale di oltre 300 enzimi [14,15].

Le prime β-lattamasi erano enzimi penicillinasi che degradavano la penicillina; hanno iniziato a comparire rapidamente nei batteri clinici [16,17]. L'introduzione di penicilline modificate e semisintetiche come la meticillina, l'ampicillina e l'amoxicillina ha portato alla graduale comparsa di β-lattamasi in grado di degradarle. La prima β-lattamasi trasferibile su plasmide è stata la TEM-1, seguita dagli enzimi TEM-2 e SHV-1 [18,19]. La TEM è il meccanismo più comune di resistenza all'ampicillina rispetto alla SHV-1, meno diffusa, sebbene entrambe abbiano la stessa affinità per questo antibiotico. La TEM e l'SHV presentano una somiglianza aminoacidica del 60% e sono inibiti da acido clavulanico, tazobactam e sulbactam. La scoperta della cefalosporina C all'inizio degli anni '60 ha inaugurato l'era delle cefalosporine sintetiche, che si pensava potessero contrastare le β-lattamasi. Strutturalmente, le cefalosporine hanno l'anello β-lattamico fuso con un anello diidrotiazinico a sei membri, rispetto alle penicilline in cui il β-lattamico è fuso con un anello tiazolidinico a cinque membri [20]. Successivamente, sono stati scoperti da fonti naturali gruppi di carbapenem e monobactami di antibiotici β-lattamici con anelli lattamici strutturalmente diversi, che hanno costituito la base per la sintesi di composti simili con modifiche. Tuttavia, gli enzimi β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), in grado di idrolizzare un'ampia gamma di cefalosporine, sono emersi dalle lattamasi TEM e SHV mediante mutazioni puntiformi [18]. Le ESBL idrolizzano un ampio spettro di cefalosporine, comprese le cefalosporine di prima, seconda e terza generazione e l'aztreonam, ma non le cefamicine e i carbapenemi, e sono inibite dall'acido clavulanico [18,21]. Come conseguenza delle mutazioni e dell'espansione del range di substrati, le ESBL hanno un'affinità minore per i β-lattami classici rispetto alle β-lattamasi ancestrali. Successivamente, sono emerse ESBL di tipo CTX-M con elevata affinità per il cefotaxime, indipendenti dalle lattamasi TEM e SHV, che si sono presumibilmente evolute dalle β-lattamasi di *Kluyvera* spp [22]. Nel corso degli anni, la CTX-M

ha superato le altre ESBL in termini di numero e distribuzione globale, con l'identificazione di oltre 230 tipi, ad oggi. La Figura 2 mostra la cronologia dell'evoluzione delle β-lattamasi in relazione all'introduzione degli antibiotici β-lattamici per uso clinico.

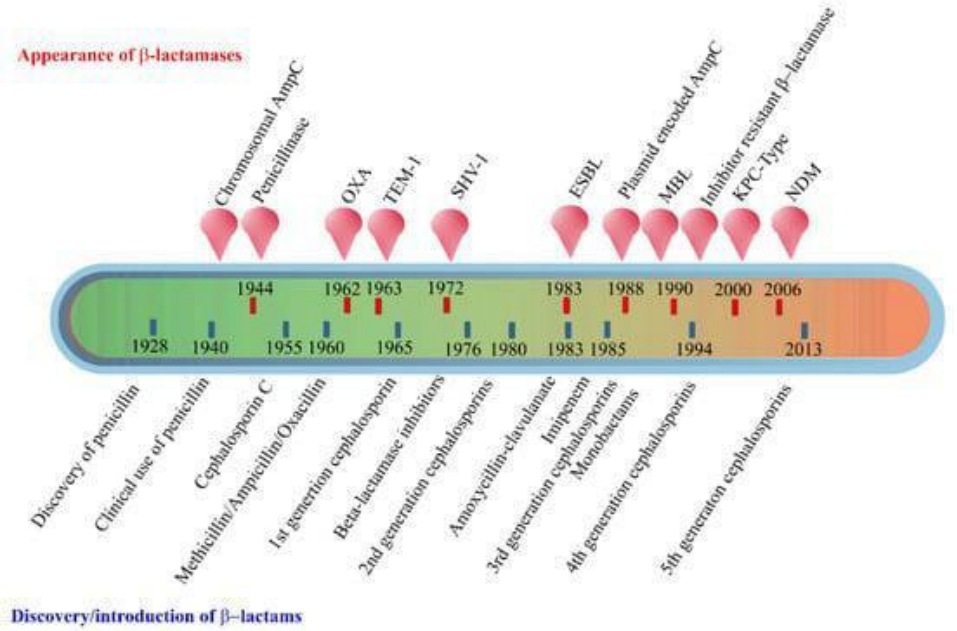


Figura 2. *Evoluzione delle β-lattamasi. Dopo cinque decenni dalla scoperta del primo enzima che degrada la penicillina, sono emerse β-lattamasi in grado di idrolizzare la maggior parte degli antibiotici β-lattamici e la resistenza agli inibitori. La capacità di tollerare un ampio spettro di β-lattamici e combinazioni di inibitori è rafforzata dalla presenza di più geni codificanti per le β-lattamasi in un singolo patogeno.*

Gli sforzi iniziali per classificare le β-lattamasi si sono basati sulle loro caratteristiche funzionali, come i profili substrato-inibitore, il peso molecolare delle proteine, il punto isoelettrico, ecc. [12,14,23]. Un secondo approccio ha utilizzato le somiglianze di sequenza aminoacidica e le attività enzimatiche per classificare le β-lattamasi in quattro gruppi principali, di cui i gruppi A, C e D sono β-lattamasi seriniche, mentre la classe B è composta da

β-lattamasi metalliche che richiedono ioni zinco nel sito attivo per le loro attività idrolitiche [12,24]. Gli enzimi del gruppo A costituiscono il gruppo più numeroso di lattamasi e comprendono alcuni degli enzimi critici per la resistenza, come le β-lattamasi di tipo TEM, SHV e CTX-M. Altre ESBL importanti includono le ESBL di tipo KPC che idrolizzano i carbapenemi, originariamente segnalate da *Klebsiella pneumoniae*, che hanno uno spettro di substrati esteso alle cefalosporine e ai carbapenemi, ma sono suscettibili di inibizione da parte di clavulanati e acido boronico [23,25]. Le cefalosporinasi AmpC (classe C) codificate cromosomicamente e descritte all'inizio della scoperta delle β-lattamasi non hanno alcuna omologia con le penicillinasi e costituiscono quindi un gruppo distinto di enzimi [26,27]. Comunemente presenti nelle Enterobacteriaceae, gli enzimi AmpC sono inducibili e prodotti a bassi livelli basali e idrolizzano preferenzialmente le cefalosporine, tra cui la cefoxitina, ma non la cefepime. Questi enzimi sono generalmente resistenti all'inibizione da parte di acido clavulanico, sulbactam o tazobactam. Le metallo-β-lattamasi o MBL appartenenti alla classe B hanno un'intensa attività idrolitica contro i carbapenemi e sono attive anche contro una serie di cefalosporine [28,29]. Nel 2009 è emersa una nuova variante, la New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM), che è stata poi segnalata in tutto il mondo [29]. L'NDM conferisce resistenza a tutti gli antibiotici β-lattamici, tranne l'aztreonam, e il plasmide che trasporta il gene *blaNDM* contiene marcatori di resistenza per diversi altri antibiotici. VIM e IMP sono altre importanti carbapenemasi di classe B comunemente riscontrate nelle Enterobacteriaceae.

Gli enzimi di tipo OXA, appartenenti al gruppo delle lattamasi di classe D, sono stati originariamente scoperti come enzimi idrolizzatori di oxacillina codificati da plasmidi in batteri che non fermentano il lattosio, come *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Shewanella*, e successivamente nelle Enterobacteriaceae attraverso lo scambio di plasmidi [30,31]. Questi enzimi sono scarsamente inibiti dagli inibitori delle lattamasi, come l'acido clavulanico. Sebbene le OXA lattamasi abbiano un ristretto range di substra-

ti composto da penicilline, cloxacillina e oxacillina, gli enzimi si sono evoluti per idrolizzare cefalosporine a spettro esteso e carbapenemi attraverso mutazioni puntiformi e queste capacità variano tra i diversi tipi di OXA [28,32].

La resistenza antimicrobica mediata dalle β-lattamasi è diffusa tra il gruppo di organismi ESKAPE (*Enterococcus*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ed *E. coli*), le cui infezioni sono solitamente associate a un onere economico significativamente più elevato e al più alto rischio di mortalità [33,34]. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha riconosciuto le Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE) come un grave flagello per la salute globale, per il quale è necessario sviluppare nuovi antimicrobici [35].

L'idrolisi enzimatica è anche un meccanismo comune di resistenza ai macrolidi, alla rifampicina e alla fosfomicina. Molti membri delle Enterobacteriaceae producono esterasi EreA ed EreB codificate da plasmidi che idrolizzano l'anello macrolattico di macrolidi a 14 e 15 membrane come eritromicina A, claritromicina e azitromicina [36,37]. L'antibiotico macrolide strutturalmente alterato non sarà più in grado di legarsi al suo sito bersaglio preferito nel ribosoma [38].

Un altro importante meccanismo di degradazione enzimatica è associato alla FosX, codificata cromosomicamente e dipendente dallo ione manganese (Mn2+), che utilizza l'acqua per scindere l'anello epossidico della fosfomicina. Altri metalloenzimi che modificano la fosfomicina sono FosA, FosB e le due epossido-chinasi FomA e FomB [39]. FosA è una glutatione-S-transferasi Mn2+ e K+ dipendente, mentre FosB è una tiolo-S-transferasi Mg2+. Il meccanismo prevede l'aggiunta di gruppi glutatione o tiolo all'anello ossiranico della fosfomicina, il che produce un farmaco inattivo [40]. Le chinasi FomA e FomB utilizzano ATP e ioni Mn2+ per fosforilare l'anello ossiranico della fosfomicina [39].

Da oltre 70 anni le tetracicline sono antibiotici ampiamente utilizzati nella medicina umana e animale [41]. La tetraciclina viene scomposta dall'enzima monoossigenasi Tet(X), che dipende dall'ossigeno e dal FAD [42]. I monoidrossilati di Tet(X) de-

compongono le tetracicline in posizione 11a, seguite da una degradazione non enzimatica. Analogamente, la monossigenazione enzimatica del gruppo naftilico degli antibiotici rifamicina da parte delle monoossigenasi (Rox) li inattiva portando alla linearizzazione dell'anello naftochinone o naftoidrochinone [43].

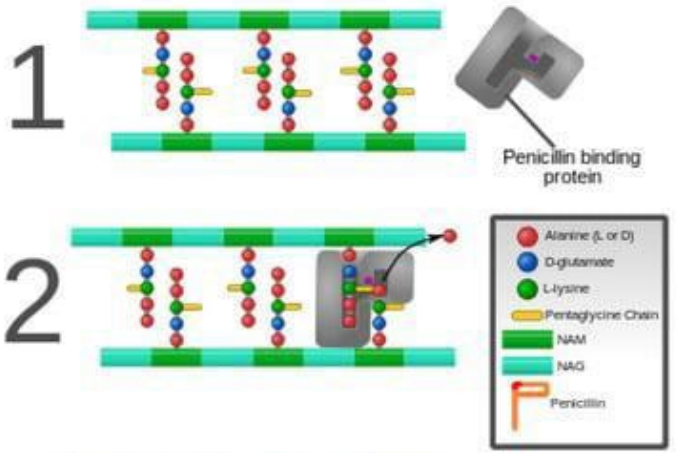
La modificazione enzimatica degli antibiotici mediante il trasferimento di gruppi funzionali, come acili, glicosili, ribosili, nucleotidili, fosforili o tioli, conferisce resistenza a una serie di antibiotici, tra cui aminoglicosidi, rifamicine, macrolidi, epossidi e cloramfenicolo [44]. Gli enzimi modificatori degli aminoglicosidi (AME) responsabili della resistenza a diversi antibiotici aminoglicosidici comprendono le *N-acetiltransferasi* (AAC), le *O-adeniltransferasi* (ANT) e le *O-fosfotransferasi* (APH). Questi enzimi catalizzano la modifica di vari gruppi ossidrilici o amminici degli aminoglicosidi, rendendoli incapaci di legarsi ai loro bersagli ribosomiali 30S [45]. Analogamente, nei batteri Gram-negativi, una ADP-ribosiltransferasi codificata da un plasmide (Arr-2) è comunemente responsabile della resistenza alla rifampicina [46]. Analogamente, il cloramfenicolo è modificato dall'acetilazione del suo gruppo 3-idrossile, dipendente dall'acetil-CoA, da parte degli enzimi cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT) [47]. L'antibiotico modificato non si lega al suo sito bersaglio, la subunità 50S dei ribosomi. Le CAT sono ampiamente distribuite tra i batteri Gram-positivi e negativi e mostrano poche somiglianze di sequenza aminoacidica, con solo 25 residui aminoacidici conservati tra tutte le varianti di CAT [47].

2.3 ALTERAZIONE DEI BERSAGLI ANTIMICROBICI

Poiché gli enzimi batterici sopra menzionati alterano le strutture dei farmaci, anche i bersagli dei farmaci possono essere alterati, impedendo il legame con il farmaco e, quindi, conferendo resistenza. I bersagli antimicrobici svolgono un ruolo vitale nella crescita o nella sopravvivenza microbica e possono quindi essere utili per mitigare l'infezione. Inoltre, questi bersagli devono

essere diversi o completamente assenti nell'uomo o nella specie animale trattata con un antimicrobico per consentire una modalità d'azione selettiva. Un esempio classico di tale bersaglio è il peptidoglicano. Il peptidoglicano è essenziale per la crescita e la sopravvivenza di molte specie batteriche e ha una struttura chimica che non è presente negli ospiti mammiferi che infettano. Ciò consente di indirizzare gli enzimi responsabili della sintesi e dell'assemblaggio del peptidoglicano. La funzione delle proteine associate a questi siti bersaglio rende impraticabile per un batterio l'evoluzione della resistenza attraverso la rimozione di queste proteine. Tuttavia, le mutazioni che consentono di mantenere la funzionalità riducendo al contempo la capacità di un agente antimicrobico di legarsi al sito bersaglio sono state una costante nella corsa agli armamenti tra sostanze antimicrobiche e batteri resistenti agli antimicrobici. Oltre al peptidoglicano, l'alterazione dei siti bersaglio è stata attribuita ai ribosomi, agli enzimi degli acidi nucleici e ai lipopolisaccaridi [48].

Come discusso in precedenza in questa rassegna, l'inibizione del peptidoglicano da parte dei glicopeptidi comporta il legame della terminazione peptidil-d-alanil-d-alanina dei precursori del peptidoglicano. Questo legame impedisce l'integrazione attraverso l'attività transglicosilasica di questi precursori nella parete cellulare [49], come mostrato nella Figura 3.



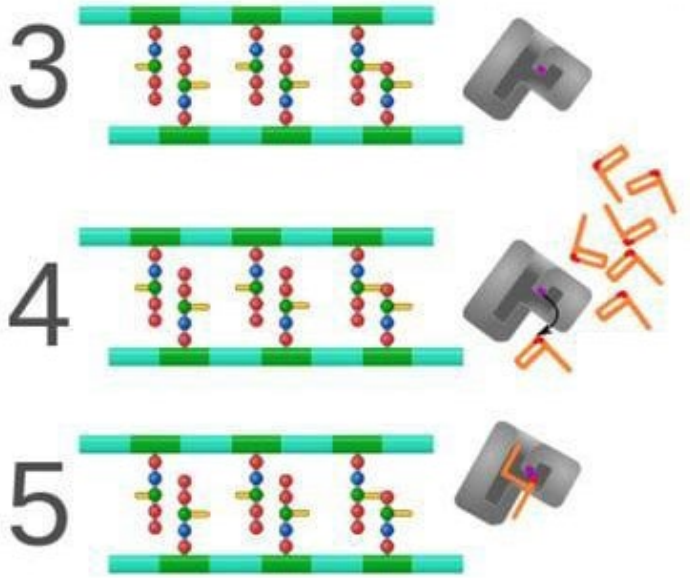


Figura 3. *Penicillina e proteine leganti la penicillina della parete cellulare batterica.* (**1**) *Lo strato di peptidoglicano della parete cellulare batterica contiene le società ripetute di N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM). Le subunità NAM legano brevi catene peptidiche variabili, di solito l-Ala e due residui distali d-Ala.* (**2**) *La PBP effettua un cross-linking con la catena laterale del peptide, liberando un Ala libero.* (**3**) *Al momento del cross-linking, la PBP si dissocia dalla parete cellulare.* (**4**) *La penicillina lega il sito attivo della PBP, influenzando la sua attività enzimatica.* (**5**) *L'anello β-lattamico della penicillina viene scisso durante la reazione con la PBP. La penicillina rimane legata covalentemente alla PBP, inibendo permanentemente il sito attivo. Le PBP alterate, come la PBP2a, non sono in grado di accogliere il legame con la penicillina, impedendo l'inibizione della sintesi della parete cellulare [48,49].*

I PCB sono uno dei meccanismi di resistenza agli antimicrobici, ma gli stessi precursori del peptidoglicano possono subire alterazioni che riducono l'affinità degli antimicrobici senza coinvolgere l'inattivazione enzimatica. È questo il caso di *Enterococcus faecium* ed *E. faecalis, di cui si* è parlato in letteratura, che sviluppano resistenza acquisendo uno dei due cluster genici correlati che codificano VanA e VanB [50,51].

Questi cluster genici producono una terminazione modificata che contiene d-alanil-d-lattato anziché d-alanil-d-alanina [50].

Questa alterazione porta a glicopeptidi con un'affinità di legame molto più bassa [52]. Pertanto, questi gruppi di geni, che si trovano su elementi trasponibili, hanno permesso la diffusione di bersagli modificati negli enterococchi. Analogamente, esistono cluster genici più rari ma correlati che hanno dimostrato di modificare i precursori del peptidoglicano, come quelli che codificano VanD [53], VanE [54] e Van G [55].

I ribosomi, che svolgono un ruolo vitale della sintesi proteica, sono comuni sia agli organismi procarioti che a quelli eucarioti, ma la loro struttura differisce notevolmente, il che li rende candidati adatti per il targeting antimicrobico [56]. L'unità ribosomiale 50S funge da sito di legame per macrolidi, lincosamidi e streptogramina B [57]. La resistenza a questi specifici antimicrobici è nota come resistenza di tipo MLS(B) [57] e deriva da una modificazione post-trascrizionale della componente 23S rRNA della subunità ribosomiale 50S, coinvolta nella metilazione o dimetilazione di basi adeniniche chiave nel dominio funzionale della peptidil transferasi [58].

Ci sono delle mutazioni nel 23S rRNA, vicino al sito di metilazione, che sono state associate anche alla resistenza al gruppo di antibiotici macrolidi in una serie di organismi, come *Helicobacter pylori* [59] e propionibatteri [60]. La resistenza ai macrolidi in S. *pneumoniae* è stata attribuita a un'alterazione delle proteine L4 e L22 della subunità 50S [61,62]. Gli ossazolidinoni si legano alla subunità 50S ma presentano una serie di interazioni più complesse associate al loro meccanismo d'azione [63]. La traslocazione del peptidil-tRNA dal sito A al sito P è ostacolata da questa classe di antibiotici, ma è stato documentato che gli enterococchi presentano un'alterazione del sito P attraverso la sostituzione di U al posto di G nella regione della peptidil-transferasi (posizione 2576) del 23S rRNA, con conseguente riduzione dell'affinità di legame nella subunità 50S per questa classe di antibiotici [64,65,66]. In *E. coli* sono state riscontrate mutazioni più strettamente associate al sito A nelle posizioni 2032 e 2447 che conferiscono resistenza al linezolid, un farmaco a base di ossazolidoni [67].

L'unità ribosomiale 30S è il bersaglio della tetraciclina e degli aminoglicosidi, che agiscono impedendo la decodifica dell'mRNA [68]. Le mutazioni del gene che codifica il 16S rRNA conferiscono resistenza a questa classe di antimicrobici [69]. Suzuki e colleghi hanno scoperto che le sostituzioni nelle posizioni 1400, 1401 e 1483 portano alla resistenza alla kanamicina in isolati clinici di *Mycobacterium* e hanno ulteriormente rafforzato l'affermazione che queste mutazioni portano alla resistenza, identificando la loro assenza in isolati di *Mycobacterium* sensibili alla kanamicina [70].

La posizione 1400 è stata la sostituzione più comune, caratterizzata da un cambiamento da A a G [70]. La stessa sostituzione da A a G in posizione 1408 ha portato a un'elevata resistenza contro amikacina, kanamicina, gentamicina, tobramicina e neomicina in isolati clinici di *Mycobacterium abscessus* [71].

2.4 PROTEZIONE DEI BERSAGLI ANTIMICROBICI

Nella sezione precedente si è parlato della resistenza antimicrobica attraverso l'alterazione dei bersagli dei farmaci. Tuttavia, i bersagli possono essere protetti anche da altri fattori specifici. Una delle principali linee di difesa contro un antimicrobico è la parete cellulare batterica [72]. Si pensa che questa struttura si sia evoluta inizialmente per proteggere dalla pressione di turgore interna della cellula; agisce anche come barriera fisica per dividere il citoplasma e la membrana cellulare dal mondo esterno [72,73,74]. Le pareti cellulari dei procarioti sono costituite da filamenti di glicani lineari reticolati da piccoli peptidi [75]. Questo sacculo di peptidoglicano (mureina) contribuisce a limitare le sostanze che possono proseguire verso la membrana cellulare e infine nel citoplasma [76].

Il peptidoglicano svolge anche un ruolo essenziale nella crescita e nella proliferazione batterica [77]. Il ruolo cruciale svolto dal peptidoglicano e dalla parete cellulare ha fatto sì che la maggior parte delle specie di batteri, ad eccezione dei *micoplasmi* e

dei batteri l-form, ne contenga le strutture [78]. Se da un lato la parete cellulare aiuta a proteggere i bersagli antimicrobici citoplasmatici, dall'altro ha finito per essere il bersaglio del primo antibiotico naturale, la penicillina, che impedisce la formazione completa di questa barriera inibendo la reticolazione dei peptidi [79]. Con una struttura protettiva difettosa, la cellula diventa vulnerabile all'ambiente interno e all'ambiente esterno, portando alla morte cellulare [80].

Con questo meccanismo di protezione compromesso dall'avvento degli antibiotici β-lattamici, i procarioti hanno iniziato a sintetizzare un altro livello di protezione: le β-lattamasi [16]. Questi enzimi aiutano a proteggere la parete cellulare di peptidoglicano dagli antibiotici β-lattamici, appunto [16]. Gli enzimi β-lattamasi contribuiscono a dare origine a dei fenotipi batterici resistenti, poiché il loro meccanismo d'azione idrolizza l'anello β-lattamico di tali antibiotici e la struttura chimica risultante non può più ostacolare la sintesi della parete cellulare batterica [81].

Questi enzimi sono così diversi che ne sono stati scoperti centinaia e raggruppati in varie classi sia nelle specie Gram-negative che Gram-positive [82]. Oltre alle β-lattamasi, alcune specie di *Stafilococchi* contengono il gene *oat*A che codifica un enzima O-acetiltransferasi, un fattore determinante che permette a queste specie di evitare l'inibizione della sintesi della parete cellulare da parte dei lisozimi [83].

Negli ultimi anni, la protezione del bersaglio è stata un meccanismo importante per la resistenza antimicrobica sia nei batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Non esistono meccanismi di protezione del bersaglio unici e uniformi. Finora sono stati definiti tre meccanismi di questo tipo: la rimozione allosterica dell'antibiotico, il ripristino della funzione del bersaglio nonostante la presenza dell'antibiotico legato e lo spostamento diretto dell'antibiotico (vedi Figura 4) [84].

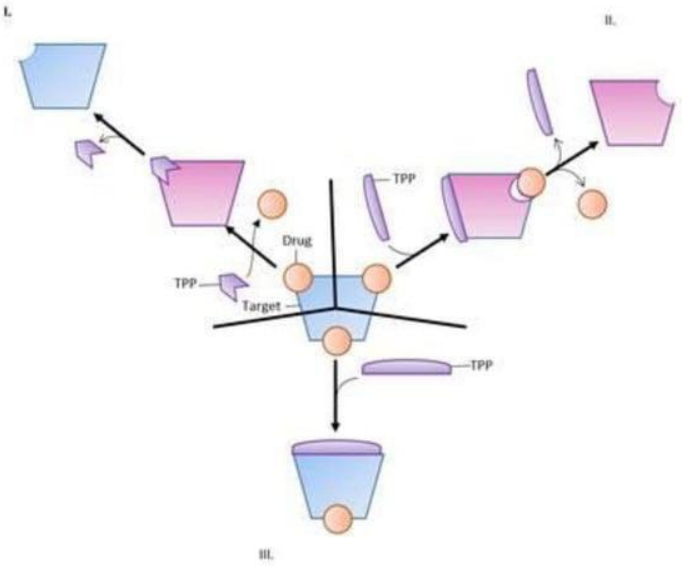


Figura 4. *Tipi di meccanismi di protezione del bersaglio antimicrobico.* **(I)** *La proteina di protezione del bersaglio (TPP) riguarda direttamente l'agente antimicrobico dal suo sito attivo sul bersaglio, impedendo l'azione antimicrobica.* **(II)** *La proteina di protezione del bersaglio lega un sito allosterico del bersaglio, che induce un cambiamento di conformazione e la dissociazione dell'agente antimicrobico dal sito del bersaglio.* **(III)** *La proteina di protezione del bersaglio induce un cambiamento conformazionale globale per ristabilire la funzione del bersaglio nonostante la formazione di un complesso bersaglio-farmaco [84]. Questa figura è stata gentilmente fornita da Ann F. Varela.*

Sono stati trovati alcuni determinanti genetici codificanti proteine che mediano la protezione del bersaglio nei cromosomi batterici e la maggior parte di questi determinanti coinvolti in questo meccanismo sono svolti da elementi genetici mobili [85]. Ad esempio, le resistenze alla tetraciclina (TetO e TetM), all'acido fusidico (FusB e FusC) e ai chinoloni (Qnr) avvengono attraverso questo meccanismo.

2.4.1 PROTEINA DI PROTEZIONE RIBOSOMIALE (RPP)

Le proteine di protezione ribosomiale della tetraciclina facilitano la protezione del bersaglio. Ad oggi, sono state descritte 13 classi di RPP e le RPP meglio caratterizzate sono TetO e

TetM [85]. TetM e TetO sono proteine citoplasmatiche solubili isolate per la prima volta rispettivamente da *Streptococcus* spp. e *Campylobacter jejuni*, ma i geni che codificano queste proteine si trovano in vari batteri [86,87]. Queste proteine appartengono a una superfamiglia di GTPasi del fattore di traduzione e agiscono come un omologo del fattore di allungamento della traduzione G (EF-G) [88,89]. TetM e TetO mediano la resistenza alla tetraciclina interferendo con la capacità del farmaco di legarsi al ribosoma [90]. Interagiscono con il ribosoma e catalizzano il rilascio della tetraciclina dal suo sito di legame in modo dipendente dal GTP [91,92,93]. Alcuni studi strutturali hanno dimostrato che sia TetM che TetO si sovrappongono al sito di legame della tetraciclina sul ribosoma, il che indica che la resistenza dei farmaci avviene attraverso lo spostamento diretto dal ribosoma [88,94]. Questi RPP alterano la conformazione del nucleotide all'interno del sito di legame del farmaco, impedendo così l'immediato reinserimento del farmaco e promuovendo il rilascio dell'aminoacil-tRNA [89].

2.4.2 PROTEINE DI RESISTENZA AI CHINOLONI

Il gene della resistenza ai chinoloni *qnr*, mediato da plasmidi, è coinvolto nella resistenza ai chinoloni e ai fluorochinoloni nei patogeni Gram-negativi, come le Enterobacteriaceae. Questo gene codifica proteine ripetute pentapeptidiche che permettono ai batteri di resistere agli effetti inibitori dei chinoloni legando e proteggendo la DNA girasi e le topoisomerasi di tipo II [5,95]. Ad oggi sono state identificate diverse famiglie di Qnr (A, B, C, D e S), con la QnrB che presenta il maggior numero di alleli. Diversi studi hanno dimostrato che la proteina Qnr interrompe le interazioni DNA girasi-quinolone e aumenta l'efflusso di chinoloni dalla cellula batterica. Il legame di Qnr a questi enzimi diminuisce l'affinità del chinolone a stabilizzarsi con il complesso che forma con il DNA cancellato dalla topoisomerasi, consentendo così il normale processo e la rilegatura del DNA [95].

2.5.POMPE DI EFFLUSSO ATTIVE DEGLI AGENTI ANTIMICROBICI

Nei casi in cui agenti antimicrobici intatti entrano nelle cellule batteriche e i bersagli dei farmaci sono liberamente accessibili, possono entrare in gioco sistemi attivi di efflusso dei farmaci. In questa sezione ci concentreremo sui trasportatori antimicrobici più studiati in quanto rappresentano dei buoni sistemi modello per lo studio e la modulazione della resistenza. I batteri patogeni utilizzano spesso proteine integrali di membrana che fungono da trasportatori di agenti antimicrobici [96]. Tali proteine di trasporto batterico servono a esportare attivamente agenti antimicrobici strutturalmente distinti dal citoplasma, dove risiedono i bersagli dei farmaci, al milieu extracellulare, dove mancano i loro bersagli molecolari [97].

Le pompe di efflusso sono presenti in tutti i batteri e sono parte integrante della fisiologia batterica, essendo coinvolte in diverse funzioni come l'espulsione di prodotti tossici del metabolismo e il mantenimento dell'omeostasi. Tuttavia, il fatto che gli antibiotici siano risultati dei substrati delle pompe di efflusso ha fatto sì che esse venissero considerate in gran parte come meccanismi batterici di resistenza antimicrobica. Nei batteri clinicamente importanti, come il *Mycobacterium tuberculosis* MDR, lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina, la *Klebsiella pneumoniae* e la *Pseudomonas aeruginosa*, le pompe di efflusso hanno un ruolo critico nel garantire la sopravvivenza batterica e l'evoluzione verso dei ceppi resistenti.

Questi sistemi batterici di pompe di efflusso multifarmaco sono alimentati dall'idrolisi dell'ATP, chiamata trasporto attivo primario [98], e da gradienti ionici elettrochimici o forze motrici ioniche, chiamate trasporto attivo secondario [99,100]. Il trasporto attivo degli agenti antimicrobici rappresenta un meccanismo di resistenza importantissimo nei patogeni batterici. Dato che più agenti antimicrobici strutturalmente distinti con modalità d'azione diverse vengono esportati nel milieu extracellulare,

le loro proprietà inibitorie della crescita nei confronti dei batteri calano, o vengono eluse del tutto.

Durante il trasporto attivo primario degli agenti antimicrobici, i batteri sfruttano l'energia biologica immagazzinata sotto forma di adenosina trifosfato (ATP) intatto per esportare i farmaci contro il gradiente di concentrazione del farmaco eseguendo l'idrolisi dell'ATP [25]. Durante l'esportazione di agenti antibatterici dalle cellule batteriche, l'ATP viene idrolizzato per dare energia alla traslocazione del farmaco attraverso il trasportatore in direzione esterna alla membrana. In questo modo, poiché il substrato del trasportatore si accumula attivamente all'esterno della cellula, la resistenza ai farmaci viene conferita al patogeno batterico [98]. Uno dei sistemi primari di efflusso di farmaci attivi più studiati nei batteri è la famiglia di pompe di efflusso ATP-binding cassette (ABC) [101,102].

La superfamiglia dei trasportatori ABC è nota per essere una delle famiglie di proteine più abbondanti tra i taxa di organismi viventi [103]. Una delle prime strutture di pompe di efflusso ABC batteriche è stata Sav1866, proveniente dal patogeno *S. aureus* [104] (Figura 5). Strutturalmente, le pompe di efflusso dei farmaci Sav1866 sono costituite da due domini transmembrana principali (TMD [*TransMembrane Domains*]) e da due domini di legame ai nucleotidi (NBD [*Nucleotide-Binding Domains*]) [104].

Durante la traslocazione e l'efflusso dell'agente antimicrobico attraverso la membrana batterica, si verifica un cambiamento conformazionale nei TMD per consentire il legame e il trasporto del substrato [105]. Nel frattempo, mentre l'agente antimicrobico viene pompato all'esterno delle cellule *di S. aureus*, l'ATP viene idrolizzato ad adenosina difosfato (ADP) all'interno della cellula dalle NBD, che ospitano l'attività di ATPasi [104,105].

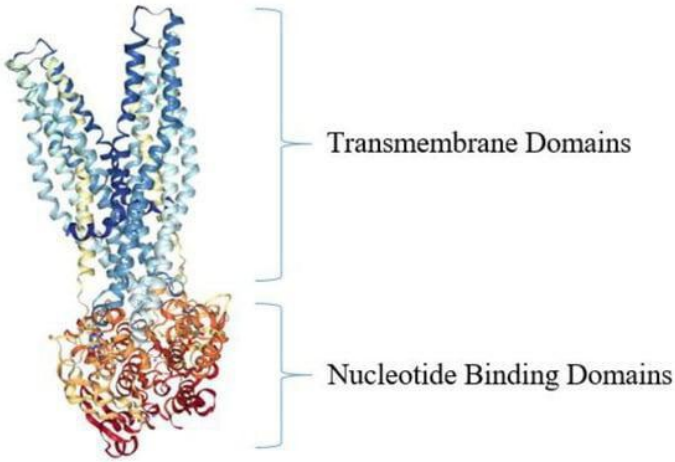


Figura 5. *Struttura cristallina della pompa di efflusso ABC batterica di S. aureus. La porzione superiore del trasportatore ABC Sav1866 è rappresentata in blu e azzurro e rappresenta i due TMD (talvolta chiamati domini di membrana, MSD) della proteina, mentre i colori arancione e rosso raffigurano i due NBD [104]. Il modello di struttura è stato generato utilizzando NGL Viewer [106] delle voci 2HYD e 2ONJ del PDB [107], come riportato [104,108].*

Le pompe di efflusso del gruppo ABC provocano la resistenza batterica a farmaci clinicamente rilevanti in *Mycobacterium tuberculosis*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, ecc. MsrA, ben presente negli organismi Gram-positivi e negativi, è responsabile della resistenza ai macrolidi [109]. Una pompa di efflusso MsrA omologa dell'eritromicina, Mel, media la resistenza ai macrolidi nello *Streptococcus pneumoniae* insieme a MefE [110]. Una maggiore espressione delle pompe di efflusso ABC Rv1217c e Rv1218c ha determinato un aumento della MIC della rifampicina, mentre la sovraespressione di Rv1218c ha aumentato la MIC dell'isoniazide [111]. In *S. pneumoniae*, le pompe di efflusso ABC PatA e PatB conferiscono resistenza a farmaci clinicamente importanti come i fluorochinoloni e sono sovraespresse negli isolati clinici [112].

La pompa di efflusso MacB di *E. coli* è una delle poche proteine di efflusso della superfamiglia ABC ben studiate, che conferisce livelli apprezzabili di resistenza ai macrolidi [113]. È stato dimostrato che questa proteina, insieme alla sua proteina di membrana esterna MacA, ha un ruolo cruciale nella virulenza di *E. coli*. In *Salmonella* Typhimurium, MacABC è necessaria per la colonizzazione dell'ospite e aiuta il batterio a superare il letale stress ossidativo indotto dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e favorisce la sua sopravvivenza all'interno dei macrofagi [114].

I trasportatori attivi secondari conferiscono anche resistenza batterica a molti agenti antimicrobici strutturalmente distinti [115,116]. Negli ultimi 30 anni, questi sistemi di pompe di efflusso antimicrobico attivo sono stati classificati in diverse grandi superfamiglie di proteine correlate sulla base di somiglianze nelle sequenze aminoacidiche, nelle strutture e nelle modalità di energizzazione [117,118].

Attualmente, queste superfamiglie sono: la superfamiglia dei grandi facilitatori (MFS [*Major Facilitator Superfamily*]) [119]; la superfamiglia dei trasportatori di farmaci/metaboliti (DMT [*Drug/Metabolite Transporter*]), che ora ospita la piccola famiglia della resistenza ai farmaci (SMR [*Small Multidrug Resistance*]) [120,121]; la famiglia MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*), che è stata inclusa nella più ampia superfamiglia di trasportatori di farmaci/oligosaccaridil-lipidi/polisaccaridi (MOP [Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide]) [122,123]; la superfamiglia di trasportatori di composti antimicrobici proteobatterici (PACE [*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*]) [124] e la superfamiglia RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*) [125]. La Figura 6 mostra diverse famiglie studiate di sistemi di trasporto di soluti batterici.

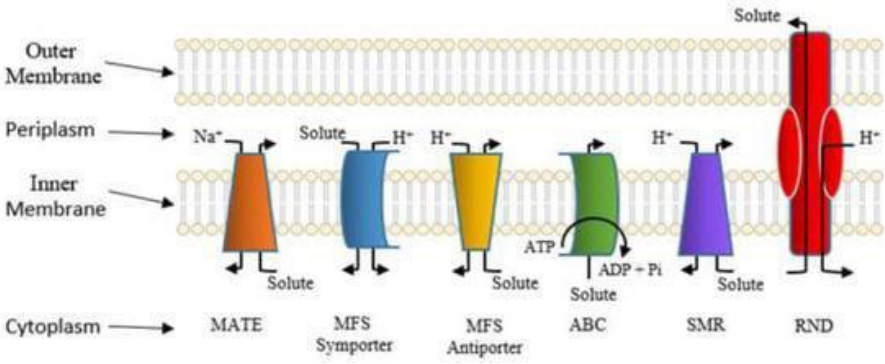


Figura 6. *Classi di trasportatori di soluti batterici studiati. Vengono mostrate le membrane batteriche esterne e interne (citoplasmatiche). Sono rappresentati anche gli spazi citoplasmatici e periplasmatici. Pi indica il fosfato, mentre Na+ e H+ indicano rispettivamente il sodio e il protone. Questa figura è stata gentilmente fornita da Ann F. Varela.*

Molti membri della MFS delle pompe di efflusso batteriche conferiscono resistenza a più agenti antimicrobici e sono considerati bersagli molecolari essenziali per la modulazione della resistenza al fine di aggirare la resistenza e ripristinare l'efficacia terapeutica degli agenti compromessi [126,127]. Sono state messe in chiaro le strutture proteiche di diverse pompe di efflusso antimicrobico batteriche appartenenti alla MFS [128]. In generale, le strutture delle MFS ospitano 12 o 14 segmenti transmembrana α-elici, due fasci apparentemente simmetrici, ciascuno appartenente alle estremità N o C-terminali, il cosiddetto ripiegamento MFS costituito da triplette di α-eliche adiacenti e dei trasporti funzionali di sequenza aminoacidica ben conservati [128,129]. Recentemente alcuni studi sulla struttura proteica della pompa di efflusso multifarmaco MdfA di *E. coli* hanno mostrato substrati legati, come il cloramfenicolo [130] (Figura 7), e inibitori [130,131], oltre a una struttura cristallina composta da una conformazione orientata verso il periplasma che suggerisce un ruolo funzionale per il trasporto antiporto, ben conservato, della sequenza C nel condurre la traslocazione del substrato attraverso le pompe antimicrobiche [132,133,134]. Studi come questi svolgeranno senza dubbio un ruolo cruciale nella valuta-

zione dei meccanismi fisiologici di efflusso degli antimicrobici attraverso la membrana e nel loro sfruttamento per lo sviluppo di inibizioni delle pompe di efflusso [135].



Figura 7. *Struttura cristallina della pompa di efflusso multifarmaco MdfA di E. coli dalla MFS. Il trasportatore MdfA è complessato con uno dei suoi substrati, il cloramfenicolo (struttura a palla e bastone). I nastri di colore diverso rappresentano le eliche transmembrana. Le anse tra i domini transmembrana sono state rimosse per chiarezza. Il modello della struttura di MdfA è stato generato utilizzando NGL Viewer [106] dal Protein Database, PDB [107], voce 4ZOW di Heng et al. [130].*

Alcune delle pompe di efflusso MFS clinicamente rilevanti e più studiate appartengono a *Staphylococcus aureus*, tra cui NorA, NorB, NorC, QacA, QacB, TetA(K), LmrS e MsrA [136]. Queste pompe di efflusso contribuiscono direttamente o indirettamente alla capacità di *Staphylococcus aureus* di tollerare gli antibiotici, ad esempio diminuendo la loro concentrazione intracellulare, il che consente ai batteri di sopravvivere più a lungo in presenza di antibiotici e di sviluppare resistenza attraverso altri meccanismi che coinvolgono mutazioni geniche, come la sovraespressione di porine e altri. In *S. aureus*, la pompa di efflusso NorA promuove lo sviluppo della resistenza alla ciprofloxacina direttamente o

contribuendo positivamente al vantaggio evolutivo fornito dalle mutazioni del gene della topoisomerasi [137]. Gli elevati livelli di espressione di *NorA* potenziano la resistenza alla ciprofloxacina, sebbene questo fenomeno sia molto variabile tra i ceppi stafilococcici clinici [137]. L'inibizione della pompa di efflusso NorA con un farmaco clinicamente approvato, il nilotinib, ha diminuito la formazione di biofilm da parte di *S. aureus* e questo farmaco può potenziare l'attività della ciprofloxacina in ambito clinico [138]. Ovviamente, le pompe di efflusso sono componenti chiave di circuiti complessi che coinvolgono la resistenza agli antibiotici, la persistenza e la virulenza [139].

Con la scoperta della famiglia SMR e la sua successiva incorporazione nella più ampia superfamiglia DMT, si è giunti all'elucidazione di una struttura cristallina a bassa risoluzione per la pompa di efflusso antimicrobica basata sulla DMT, chiamata EmrE, che è stata un efficace sistema modello per il trasporto antimicrobico [121,140,141]. Mentre la natura strutturale di EmrE è stata controversa in termini di orientamento dei monomeri del suo dimero [141,142], le simulazioni di dinamica molecolare, gli studi biochimici e fisiologici relativi alle relazioni struttura-funzione e all'inibizione dell'efflusso hanno gettato nuova luce sul suo meccanismo di traslocazione del substrato [143,144,145,146,147].

La struttura cristallina del trasportatore RND AcrB di *E. coli*, riportata per la prima volta nel 2002 [148], consiste in un trimero [149,150]. È noto che il trimero AcrB risiede nella membrana interna dei batteri Gram-negativi [151]. Se pensiamo a un sistema meccanico per il trasporto antimicrobico, si ritiene che l'AcrB ruoti in modo simile a una pompa peristaltica, in cui la pompa passa ripetutamente tra fasi di estrusione, accesso e legame [152,153]. Inoltre, è stato dimostrato che la pompa di efflusso AcrB si assembla in un complesso tripartito con una proteina periplasmatica, AcrA, e una proteina della membrana esterna, TolC [154]. Questo sistema tripartito di efflusso di farmaci antimicrobici è stato trovato in una varietà di patogeni batterici pericolosi per la vita e conferisce resistenza a diversi agenti antibatterici clinicamente rilevanti [155].

Il sistema di pompa di efflusso multifarmaco tripartito RND di *E. coli* è composto da tre domini principali che costituiscono una struttura tripartita. Il terzo superiore della struttura indica il canale associato alla membrana esterna, TolC; la sezione centrale comprende il dominio associato al periplasma, AcrA, e la terza sezione è costituita da AcrB, un membro della superfamiglia RND ampiamente studiato [150].

In generale, queste famiglie distintive di sistemi di trasporto antimicrobico servono a conferire ai patogeni batterici maggiori capacità di sopravvivere allo stress antimicrobico [136]. Oltre ad AcrB-TolC, alcune delle pompe di efflusso RND più studiate e clinicamente rilevanti sono MexB, MexF e MexY di *Pseudomonas aeruginosa*, AdeB di *Acinetobacter baumannii*, CmeB di *Campylobacter jejuni* e MtrD di *Neisseria gonorrhoeae* nei batteri Gram-negativi [156]. Negli isolati clinici di *Bacteroides fragilis*, la sovraespressione della pompa di efflusso *bmeB* e le mutazioni puntiformi di GyrA contribuiscono a un livello clinico di resistenza ai fluorochinoloni e ai β-lattamici [157]. Uno studio recente suggerisce che la pompa di efflusso AcrAB abbia un ruolo nelle fasi iniziali della transizione batterica dalla resistenza transitoria agli antibiotici alla resistenza permanente. La minore espressione del gene di riparazione del DNA *mutS* nei ceppi che sovraesprimono *AcrAB* contribuisce a una maggiore frequenza di mutazioni spontanee e quindi a una maggiore probabilità di sviluppo della resistenza [158]. Pertanto, la presenza di una pompa di efflusso e il suo livello di espressione non possono essere considerati isolatamente, ma devono essere correlati ad altri meccanismi di resistenza che potrebbero agire in sinergia con le pompe di efflusso. Di conseguenza, questi sistemi di trasporto dei farmaci rappresentano bersagli desiderabili per gli inibitori [159] al fine di aggirare la resistenza e ripristinare l'efficacia terapeutica di patogeni batterici multiresistenti [10,126,127,128,136,160]. Di conseguenza gli studi molecolari sulle strutture dei trasportatori e sui meccanismi di efflusso continueranno a essere rilevanti in un futuro prossimo [161].

Purtroppo mancano le conoscenze fondamentali sui meccanismi molecolari del trasporto multifarmaco. Ad esempio, sap-

piamo ancora poco sulle modalità che legano i sistemi energetici alla traslocazione antimicrobica attraverso la membrana. Inoltre, non abbiamo ancora capito come i trasportatori antimicrobici dettino il trasporto di più substrati, impedendo al contempo il passaggio di substrati indesiderati o la fuoriuscita di ioni relativamente più piccoli, come ioni sodio o protoni. Per molti, se non tutti, questi trasportatori antimicrobici non abbiamo ancora un quadro chiaro della natura delle configurazioni strutturali assunte durante ciascuna delle fasi specifiche dei loro cicli di trasporto. In sintesi, resta ancora molto lavoro da fare prima di poter comprendere chiaramente la fisiologia del trasporto antimicrobico sia a livello di indagine fondamentale che applicata.

2.6 RIDUZIONE DELLA PERMEABILITÀ ANTIMICROBICA NELLE CELLULE BATTERICHE

A differenza dei sistemi di efflusso attivo dei farmaci, dove l'esportazione è un mezzo efficace di resistenza, i batteri possono anche semplicemente impedire l'ingresso degli agenti antimicrobici. Un importante meccanismo di resistenza batterica agli agenti antimicrobici consiste nel prevenire la permeabilità ai farmaci e l'accesso all'ambiente interno delle cellule patogene [162]. I ceppi di specie batteriche patogene Gram-negative, come *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella enterica*, sono particolarmente problematici [163]. I sistemi molecolari coinvolti nella ridotta permeabilità degli agenti antimicrobici comprendono meccanismi di resistenza a livello della parete cellulare batterica. La natura strutturale estesa dello strato lipopolisaccaridico costituisce un'ottima barriera al passaggio di piccole molecole, specialmente quelle che hanno proprietà inibitorie della crescita [164]. Un altro importante meccanismo molecolare per conferire resistenza attraverso la riduzione della permeabilità coinvolge le porine, che sono proteine integrali della membrana esterna con canali simili a pori pieni d'acqua che permettono il passaggio di molecole con dimensioni e cariche

specifiche [165]. Ci sono diverse possibili relazioni tra la resistenza antimicrobica batterica e le porine della membrana esterna. Una porina di tipo largo può essere altamente selettiva verso l'ingresso di alcuni nutrienti, come gli zuccheri, e non consentire il passaggio di molti agenti antimicrobici [165]. Invece se le porine non sono dotate di proprietà così selettive, allora le molecole di porina possono essere eliminate dalla membrana o interrotte da mutazioni funzionali [165,166]. In altri casi le porine non selettive possono essere regolate da bloccanti di canale o da modulatori antisenso specifici per l'RNA [167,168].

Un noto sistema di porine che conferiscono resistenza antimicrobica è quello di *E. coli* e delle sue proteine della membrana esterna OmpC, OmpF e PhoE [149,151]. Altri sistemi di porine ben studiati sono quelli di *Acinetobacter baumannii* e OprD di *P. aeruginosa*, entrambi microrganismi riconosciuti come gravi patogeni [169,170]. Le strutture cristalline delle porine sono state risolte ad alta risoluzione. Ad esempio, la struttura di OmpF di *E. coli* è stata una delle porine studiate per prime e meglio comprese (Figura 8) [171,172], mentre la struttura di OprO di *P. aeruginosa* è uno degli esempi più recenti di determinazione di molecole di porine ad alta risoluzione [173].

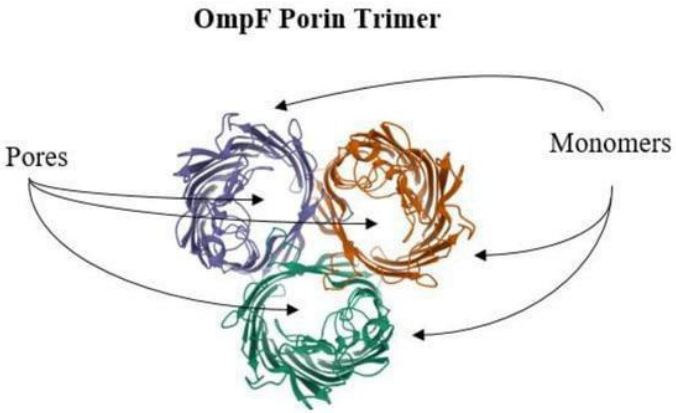


Figura 8. La *proteina della membrana esterna, OmpF, è una porina di Escherichia coli. La porina OmpF è un apparato trimerico composto da tre monomeri. La struttura*

della porina OmpF è stata generata con NGL Viewer [106] dal Protein Database, PDB [107], voce 2OMF di Cowan et al. [174].

La struttura complessiva della porina OmpF consiste in tre monomeri che costituiscono un apparato trimerico (Figura 8) [174]. Ciascuno dei monomeri è composto da elementi transmembrana a filamento β che producono un motivo strutturale a β-barile gated [175]. I dati fisiologici molecolari suggeriscono che ciascuno dei monomeri ospita siti di legame per agenti antimicrobici [165]. Il grado di selettività per i substrati è oggetto di studi in corso e deve ancora essere condotto molto lavoro molecolare per dimostrare definitivamente i precisi percorsi molecolari dei substrati idrosolubili attraverso i canali dedicati, nonché i loro meccanismi di gating.

Lo strato di lipopolisaccaridi (LPS) dei batteri Gram-negativi svolge un ruolo molto importante e diretto nella resistenza agli antibiotici. Essendo lo strato più esterno dei batteri Gram-negativi, l'LPS entra in contatto diretto con i composti antibatterici e le sue interazioni con essi decidono la suscettibilità dei batteri ai composti inibitori. I peptidi antimicrobici cationici (CAMP) sono un gruppo di antibatterici che interagiscono specificamente con l'LPS e lo disgregano spostando i cationi divalenti, che stabilizzano l'LPS neutralizzando la sua carica negativa [176]. In *E. coli*, la composizione dell'oligosaccaride centrale dell'LPS e la composizione zuccherina della parte esterna determinano la suscettibilità ai peptidi antimicrobici [177]. L'LPS è anche un bersaglio per gli antibiotici peptidici colistina e polimixina B. Questi antibiotici peptidici cationici interagiscono con il gruppo acido fosforico del lipide A e sostituiscono gli ioni calcio e magnesio ad esso associati, provocando la destabilizzazione dell'LPS e la fuoriuscita del contenuto cellulare che alla fine causa la morte dei batteri [178]. La resistenza all'antibiotico peptidico colistina mediata dai geni *mcr* coinvolge i geni *hpap2* o *dgk*A che codificano rispettivamente la fosfatasi dell'acido fosfatidico di tipo 2 (PAP2) e la diacilglicerolo chinasi, coinvolte nella biosintesi dell'LPS [179]. Nell'*E. coli,* una complessa interazione di protei-

ne, come PmrA, PmrD e PhoPQ, è coinvolta nella modifica del lipide A in condizioni di crescita limitate dal Mg2+, portando infine alla resistenza batterica ai peptidi antimicrobici cationici come la polimixina B [180]. Un meccanismo d'azione antibatterica nettamente diverso è mostrato dal peptide antimicrobico cationico thanatin, che agisce sui batteri mediante agglutinazione cellulare dopo aver interagito con l'LPS [181]. Questo peptide è efficace contro diversi batteri Gram-negativi multiresistenti ai farmaci [182]. Tuttavia, i meccanismi delle attività inibitorie della thanatina contro i batteri Gram-positivi e i funghi non sono stati ben chiariti. Le AMP come la thanatina hanno ravvivato la speranza di sviluppare terapie antimicrobiche efficaci, da sole o in combinazione con gli antibiotici, contro i batteri molto resistenti ai farmaci [183].

2.7 OBIETTIVI FUTURI

I patogeni batterici sono agenti causali essenziali di gravi malattie infettive [184]. Per questo motivo, sono stati compiuti molti sforzi nello sviluppo della chemioterapia, per affrontare i numeri elevati di morbilità e mortalità [185,186]. Pertanto, le continue ricerche per migliorare i metodi di igiene personale, la manipolazione e la preparazione degli alimenti, il lavaggio delle mani, l'igiene pubblica e l'educazione a tutti i livelli saranno al centro di un intenso interesse.

Nei centri di cura e assistenza medica, la stewardship antimicrobica è ancora un approccio promettente e si continua a investire molta energia nel suo sviluppo [187,188]. Ci si dovrà indubbiamente concentrare sugli studi di resistenza multifarmaco nei batteri presenti nella medicina veterinaria e nelle pratiche agricole per ridurre la trasmissione e la persistenza delle infezioni in queste aree [9].

I nuovi incentivi per scoprire nuovi agenti antibatterici con nuove modalità d'azione sono pochi e i progressi su questo fronte sono lenti [189,190]. Una strada promettente nella lotta contro

i patogeni multiresistenti ai farmaci comporta lo studio clinico di agenti non antibiotici, ad esempio gli agenti antibatterici, gli agenti antinfiammatori non steroidei, gli anestetici e le statine [191]. Recentemente, una serie di strategie antinfettive nuove e ben sviluppate per aggirare i patogeni multiresistenti ai farmaci è stata recensita altrove [10]. L'indagine futura potrebbe vertere su queste e altre modalità strategiche, che riducano le condizioni della diffusione delle infezioni batteriche.

2.8 OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

I patogeni batterici che hanno acquisito specifici meccanismi di resistenza antimicrobica sono emersi come gravi agenti clinici di infezione, il che causa un problema di salute pubblica su scala mondiale. Tali meccanismi cellulari di resistenza antimicrobica comprendono le pompe di efflusso multifarmaco, la degradazione enzimatica dei farmaci, la formazione di biofilm, la modifica del bersaglio farmacologico e la protezione del bersaglio. Molti determinanti genetici della resistenza antimicrobica batterica sono trasferibili a specie non correlate, dato che hanno evoluto nuovi mezzi di movimento attraverso le popolazioni umane. Per ridurre le condizioni che favoriscono l'emergere e la diffusione delle infezioni cliniche sono state prese in considerazione nuove strategie. Le misure da prendere sono: lo sviluppo di nuovi chemioterapici, come quelli con nuovi bersagli cellulari; la continuazione delle pratiche di salute pubblica; l'educazione; la gestione clinica degli antimicrobici; la continua ricerca molecolare sui meccanismi di resistenza.

3 - RESISTENZA ANTIMICROBICA: L'APPROCCIO ONE HEALTH

Tratto e tradotto da
Velazquez-Meza M.E., Galarde-López M., Carrillo-Quiróz B., Alpuche-Aranda C.M., *Antimicrobial resistance: One Health approach*, Veterinary World, 2022, 15(3): 743-749.

doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2022

Abstract
In questa ricerca si conduce una revisione della resistenza antimicrobica (AMR) come parte dell'approccio One Health. Sono sottoposte a revisione le pubblicazioni contenenti i termini "resistenza antimicrobica" e "One Health". Tra i problemi di salute globale, l'AMR è quello che illustra più chiaramente l'approccio One Health. L'AMR è un problema globale che riguarda l'uomo, l'ambiente e gli animali. È legato a ciascuna di queste tre componenti a causa dell'uso irresponsabile ed eccessivo di antimicrobici in vari settori (agricoltura, allevamento e medicina umana). La gestione impropria degli antimicrobici, il controllo inadeguato delle infezioni, i detriti agricoli, gli inquinanti nell'ambiente e la migrazione di persone e animali infettati da batteri resistenti facilitano la diffusione della resistenza. Lo studio si propone di analizzare il problema della resistenza antimicrobica da una prospettiva sanitaria per analizzare i diversi attori coinvolti in One Health.

Parole chiave: antimicrobici, uomo, animali, piante.

3.1 INTRODUZIONE

Tra i problemi di salute globale, la resistenza antimicrobica (AMR) è quello che meglio illustra l'approccio One Health. L'ap-

proccio One Health è definito come uno sforzo congiunto di varie discipline che si uniscono per fornire soluzioni per la salute umana, animale e ambientale [1]. La resistenza antimicrobica è legata a ciascuna di queste tre componenti a causa dell'uso irresponsabile ed eccessivo di antimicrobici in vari settori (agricoltura, allevamento e medicina umana) [2,3]. Sotto la pressione della selezione antimicrobica, i batteri acquisiscono geni di resistenza ed elementi genetici mobili che possono diffondersi ad altri batteri dello stesso genere o di genere diverso. Quando i batteri acquisiscono resistenza agli antimicrobici, acquisiscono anche una maggiore capacità di proliferare negli animali, nell'uomo e nel mondo naturale [4]. La cattiva gestione degli antimicrobici, il controllo inadeguato delle infezioni, i residui agricoli, i contaminanti nell'ambiente e la migrazione di persone e animali infettati da batteri resistenti facilitano la diffusione della resistenza [4,5]. La resistenza antimicrobica è un problema globale critico che riguarda la salute umana, ambientale e animale (Figura 1). Poiché la resistenza antimicrobica è un problema complesso, è necessario esaminarlo da diverse discipline per inquadrarlo nell'approccio One Health [6-8]. L'approccio "One Health" ha avuto origine nel XIX secolo, quando Rudolf Virchow ha introdotto il termine "zoonosi", che mette in relazione tra salute umana e animale [9]. Successivamente, Calvin Schwabe ha dato importanti contributi alle discipline della salute pubblica, dell'epidemiologia e della medicina tropicale. Ha introdotto il concetto di medicina unica, riaffermando la stretta relazione tra medicina umana e medicina animale [10]. Nel 2004, la Wildlife Conservation Society ha organizzato un congresso per discutere le implicazioni della trasmissione delle malattie nella fauna selvatica, negli animali domestici e nell'uomo. Sulla base di questo incontro, sono stati stabiliti i Principi di Manhattan per combattere le malattie infettive e mantenere l'equilibrio degli ecosistemi [11]. Lo studio si proponeva di analizzare il problema della resistenza antimicrobica da una prospettiva sanitaria per analizzare i diversi attori coinvolti in One Health.

3.1.1 LA RESISTENZA ANTIMICROBICA SECONDO L'APPROCCIO ONE HEALTH

È particolarmente preoccupante la rapida diffusione globale di batteri multiresistenti ai farmaci che causano infezioni non trattabili con gli antimicrobici attuali. Nel 2019, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha identificato 32 antimicrobici in fase di sviluppo ospedaliero, di cui solo sei classificati come innovativi. La mancanza di antimicrobici si ripercuote sui sistemi sanitari globali. Attualmente, le infezioni causate da microrganismi resistenti agli antimicrobici sono difficili da trattare perché gli antimicrobici sono sempre più inefficaci contro queste infezioni, con conseguenti tassi di mortalità più elevati. Sono necessari nuovi antimicrobici per controllare le infezioni causate dai principali agenti patogeni indicati dall'OMS. Ora, a meno che il modo in cui vengono utilizzati gli antimicrobici attuali non sia cambiato, questi nuovi antimicrobici subiranno lo stesso destino degli antimicrobici attuali e diventeranno inefficaci. La capacità antimicrobica AMR ha un impatto significativo sulle economie nazionali e sui loro sistemi sanitari, poiché influisce sulla produttività dei pazienti o degli operatori sanitari a causa del prolungamento delle degenze ospedaliere con costi economici elevati. Il fattore principale della resistenza antimicrobica comprende l'uso improprio ed eccessivo di antimicrobici, la mancanza di accesso all'acqua potabile, ai servizi igienici e all'igiene per gli esseri umani e gli animali, le scarse misure di prevenzione e controllo delle infezioni negli ospedali, lo scarso accesso ai farmaci e ai vaccini, la mancanza di consapevolezza e conoscenza e le irregolarità legislative [12]. La resistenza antimicrobica rappresenta un problema di salute pubblica globale, per il quale sono stati istituiti dei sistemi di sorveglianza epidemiologica, con l'obiettivo di promuovere delle collaborazioni volte al benessere della salute umana e animale e all'equilibrio dell'ecosistema. Diverse organizzazioni internazionali (l'Organizzazione mondiale per la salute animale [OIE, *Office International des Epizooties*], l'OMS e l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agri-

coltura [FAO]) hanno unito le forze per sviluppare un Piano d'azione globale sulla resistenza antimicrobica - OMS [12]. Questo piano prevedeva lo studio della resistenza antimicrobica a partire dalla sorveglianza e dalla ricerca. Il gruppo consultivo ha stabilito le linee guida per la sorveglianza della resistenza antimicrobica per garantire che tutti i Paesi sorvegliassero congiuntamente l'uso e il consumo di antimicrobici nella popolazione umana e animale. Queste linee guida forniranno una chiara comprensione del modo in cui la resistenza antimicrobica si diffonde in ambienti diversi e in aree specifiche. Consentiranno di studiare la correlazione tra la resistenza antimicrobica e l'uso di antimicrobici in un contesto diverso (animali, esseri umani e ambiente) e di valutare l'effetto degli interventi all'interno e tra i settori [13,14,15]. Il Gruppo di coordinamento sulla resistenza antimicrobica (di OMS, OIE e FAO) ha presentato al Segretario generale delle Nazioni Unite, nell'aprile 2019, il rapporto intitolato "We can't: securing the future against drug-resistant infections". Inoltre, è stata istituita una segreteria congiunta (FAO, OIE e OMS), con sede presso l'OMS, per promuovere la collaborazione tra più parti interessate sulla resistenza antimicrobica. Sono state concordate nuove misure di governance, come il gruppo di leader mondiale sulla resistenza antimicrobica, il gruppo indipendente di reporting sull'azione antimicrobica e la piattaforma collaborativa multilaterale. Una delle strategie per aumentare la consapevolezza del problema della resistenza antimicrobica è stato il lancio della "Settimana globale di sensibilizzazione sugli antimicrobici". Dal 2020 si chiamerà "Settimana mondiale di sensibilizzazione sugli antimicrobici", riferendosi a tutti gli antimicrobici: antibiotici, antimicotici, antiparassitari e antivirali. Si tratta di una campagna globale che mira ad aumentare la consapevolezza della resistenza antimicrobica in tutto il mondo e a incoraggiare le migliori pratiche tra la popolazione generale, gli operatori sanitari e i responsabili politici per frenare l'evoluzione e la diffusione delle infezioni resistenti ai farmaci. Nel 2015, l'OMS ha lanciato il Sistema di sorveglianza globale della resistenza antimicrobica (GLASS) per colmare le lacune di cono-

scenza e guidare le strategie a tutti i livelli. GLASS è stato creato per integrare progressivamente i dati di sorveglianza sugli antimicrobici utilizzati nell'uomo, tracciare l'uso degli antimicrobici e comprendere il ruolo della resistenza antimicrobica nella catena alimentare e nell'ambiente. Fornisce un approccio standardizzato alla raccolta, all'analisi, all'interpretazione e alla condivisione dei dati per Paese, regione e area, consentendo di monitorare lo stato dei sistemi di sorveglianza nazionali nuovi o esistenti, sottolineando la rappresentatività e la qualità dei dati raccolti. Nel 2017, l'OMS ha sviluppato un elenco di agenti patogeni prioritari per guidare la ricerca e lo sviluppo di nuovi antimicrobici, strumenti diagnostici e vaccini. L'OMS esamina annualmente i progetti di sviluppo antimicrobico preclinico e clinico per valutarne i progressi rispetto agli agenti patogeni prioritari. Questo elenco sarà aggiornato nel 2022. Inoltre, l'Alleanza globale per la ricerca e lo sviluppo di antibiotici è un'iniziativa congiunta dell'OMS e dell'Iniziativa sui farmaci per le malattie trascurate (DND, *Drugs for Neglected Diseases*), che sostiene la ricerca e lo sviluppo attraverso partenariati pubblico-privati. La partnership mira a sviluppare e implementare cinque nuovi trattamenti contro i batteri resistenti ai farmaci identificati dall'OMS come la più grande minaccia entro il 2025 [12].

3.1.2 USO DEGLI ANTIMICROBICI NELL'UOMO, NEGLI ANIMALI E NELLE PIANTE

Alcuni antimicrobici sono stati utilizzati per decenni prima che si sviluppasse la resistenza, mentre altri antimicrobici hanno sviluppato la resistenza in tempi molto più brevi. Gli antimicrobici a lento sviluppo di resistenza, in particolare la vancomicina, erano molto apprezzati per la loro capacità di continuare a trattare infezioni che non potevano essere trattate con altri antimicrobici comunemente usati. Oggi, l'aumento della resistenza alla vancomicina è preoccupante, poiché alcuni ceppi di batteri che in precedenza rappresentavano un rischio sanitario relativamente minore, come gli enterococchi resistenti alla vancomici-

na, contribuiscono notevolmente alla mortalità e alla morbilità, in particolare negli ospedali [6]. Gli antimicrobici sono utilizzati in vari modi negli animali, compresi gli animali domestici, i pesci d'allevamento nei sistemi di acquacoltura, api e animali da allevamento.



Figura 1: Rappresentazione schematica della resistenza agli antimicrobici nell'ottica One Health [Fonte: Figura preparata dagli autori]. Veterinary World, EISSN: 2231-0916 745 Disponibile su www.veterinaryworld.org/Vol.15/March-2022/27.pdf

Gli antimicrobici sono utilizzati per vari scopi (terapeutici, profilattici e promotori dello sviluppo) e svolgono un ruolo importante nella produzione animale. Si stima che il volume di antimicrobici utilizzati negli animali a livello mondiale sia superiore a quello degli esseri umani. La maggior parte delle classi di antimicrobici utilizzate nell'uomo sono prescritte per gli animali, comprese le classi di antimicrobici vitali per la medicina umana, come i beta-lattami ad ampio spettro e i chinoloni [16]. Alcuni antimicrobici usati nell'uomo e negli animali (te-

traciclina, triazoli e streptomicina) sono usati terapeuticamente nelle piante. La resistenza antimicrobica può essere facilmente trasferita tra e all'interno di ecosistemi e popolazioni diverse; i batteri zoonotici resistenti possono essere trovati nel suolo e da lì possono infettare piante, ortaggi e frutta. È stato documentato che l'uso di antimicrobici in agricoltura induce funghi resistenti agli antibiotici trasmessi dall'ambiente all'uomo [17]. Esistono alcune classi di antimicrobici solo per uso umano (carbapenemi) e altre solo per uso animale (flavofosfolipolo e ionofori) [18,19]. Altri antimicrobici per uso clinico, come la tetraciclina e la streptomicina, sono utilizzati per la profilassi e il trattamento contro i batteri che causano delle infezioni nella frutta [20]. Le dosi di antimicrobici utilizzate in acquacoltura possono essere più elevate di quelle prescritte per il bestiame. I residui di antimicrobici rimangono nei prodotti ittici e possono rimanere a lungo negli ambienti acquatici attraverso gli escrementi. Questi residui si diffondono rapidamente nei corpi idrici, esercitando una pressione selettiva [21]. Gli antimicrobici sono ampiamente utilizzati come promotori della crescita, e questo è il motivo principale dei grandi volumi di antimicrobici utilizzati nell'industria alimentare animale [22].

3.2 USO DEGLI ANTIBIOTICI SECONDO L'APPROCCIO ONE HEALTH

3.2.1 ESEMPI DI ANTIBIOTICI UTILIZZATI NELL'UOMO E NEGLI ANIMALI

Colistina

La colistina (polimixina B) è un antibiotico altamente battericida utilizzato da decenni nell'uomo e negli animali, ma la sua somministrazione sistemica causa nefrotossicità [23]. L'uso di questo antibiotico è limitato al trattamento di pazienti con infezioni cutanee o fibrosi cistica. Tuttavia, la frequenza della somministrazione sistemica di colistina è aumentata per il trat-

tamento di infezioni causate da batteri resistenti ai carbapenemi (Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa) [24-26]. Nei Paesi in cui la colistina viene utilizzata per il trattamento di infezioni o come promotore di crescita nella produzione animale, è stato osservato un uso eccessivo di questo antibiotico rispetto alle dosi umane, anche se questo varia da Paese a Paese [24,27,28]. La resistenza alla colistina era inizialmente codificata a livello cromosomico, ma nel 2015 è stato riportato che il gene mcr-1 mediato da un plasmide causa la resistenza alla colistina in ceppi di E. coli isolati da campioni di alimenti, animali ed emocolture in Cina [29]. Inoltre, il gene mcr-1 è presente in altri generi batterici (P. aeruginosa, Enterobacter spp. e Klebsiella pneumoniae) [29]. Altri studi hanno riportato la presenza del gene mcr-1 in varie parti del mondo in batteri isolati da campioni ambientali, animali e di acque superficiali [29,30]. L'emergere della resistenza alla colistina indica che la resistenza può aumentare ulteriormente con l'uso di dosi elevate di antimicrobici come promotori della crescita o per trattare le infezioni. Lo stesso problema è stato osservato quando l'avoparcina è stata utilizzata come promotore di crescita. Inoltre, la vancomicina, un altro glicopeptide utilizzato per lo Staphylococcus aureus resistente alla meticillina (MRSA), ha provocato una resistenza alle infezioni gravi causate da enterococchi [31,32].

Cefalosporine di terza generazione

Questi antibiotici beta-lattamici sono ampiamente utilizzati negli animali e nell'uomo; il ceftriaxone, il cefotaxime e altre cefalosporine sono usate per trattare diverse infezioni nell'uomo: infezioni del tratto urinario, addominali, polmonari e del flusso sanguigno [33]. Per la sua utilità nel trattamento dei batteri associati all'AMR, questo gruppo di antibiotici è stato classificato come "significativo" per la salute [34]. Il ceftiofur è la cefalosporina veterinaria più utilizzata, seguita da cefoperazone, cefovecina e cefpodoxima. Il ceftiofur è usato in molti Paesi per il trattamento delle infezioni batteriche, principalmente negli

animali destinati al consumo umano. La sua applicazione è limitata all'uso parenterale e viene utilizzata negli animali singolarmente o in gruppo. A seconda della specie animale, il ceftiofur viene utilizzato per trattare meningite, setticemia, polmonite, artrite settica, polisierosite e metrite, oltre ad altri tipi di infezioni. Talvolta viene utilizzato anche per le malattie respiratorie, per la profilassi dei bovini da carne o per prevenire le infezioni da E. coli nei polli da carne [35]. In Europa, che registra i dati sull'uso degli antibiotici da molti anni, nel 2017 sono state utilizzate circa 18 tonnellate di cefalosporine di terza e quarta generazione, principalmente negli animali destinati al consumo umano [28]. Ciò rappresenta circa lo 0,2% dell'uso totale di antimicrobici negli animali in Europa. Negli Stati Uniti, l'uso totale di cefalosporine per gli animali è stato di circa 31,44 tonnellate nel 2018 [36]. Le beta-lattamasi a spettro esteso sono in grado di inattivare le cefalosporine di terza generazione (ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime) e l'aztreonam.

I geni che codificano per questa resistenza sono trasferiti da plasmidi e trasposoni. Le beta-lattamasi AmpC sono state individuate prima nei cromosomi e successivamente espresse nei plasmidi, il che indica la presenza di un trasferimento genico orizzontale tra gli enterobatteri [37]. Oggi è segnalata in molti Paesi la resistenza ai ceppi di E. coli e di K. pneumoniae alle cefalosporine che causano gravi infezioni. Ciò ha portato a un aumento dell'uso di diversi antimicrobici, come i carbapenemi [38]. Il ceftiofur è utilizzato principalmente per prevenire le infezioni da E. coli e le infezioni del sacco vitellino [39,40]. È stato dimostrato che questo trattamento seleziona ceppi di Salmonella resistenti alle cefalosporine; questo batterio causa gravi malattie nell'uomo ed è associato al consumo di prodotti avicoli contaminati [39-41]. Il monitoraggio effettuato dal *Canadian Integrated Program for AMR Surveillance* ha rivelato una correlazione temporale tra la resistenza al ceftiofur e al ceftriaxone nei ceppi di Salmonella Heidelberg isolati dal pollame e dall'uomo [42].

Fluorochinoloni

I fluorochinoloni sono una famiglia di agenti ad ampio spettro utilizzati per il trattamento delle infezioni respiratorie e del tratto urinario e sono attivi contro molti batteri Gram-positivi e Gram-negativi. La resistenza ai fluorochinoloni è causata dalla perdita di porine, dalla presenza di pompe di efflusso o dall'alterazione dei siti bersaglio della DNA girasi e della topoisomerasi IV. La resistenza ai chinoloni applicati orizzontalmente è stata descritta per la prima volta nel 1998. Il gene qnr, situato in un elemento genetico mobile, è responsabile di questo tipo di resistenza [43]. I fluorochinoloni sono un'altra classe di antimicrobici importanti in cui è emersa una resistenza tra gli isolati di Campylobacter jejuni nel pollame [44]. In Australia, dove i fluorochinoloni non sono mai stati approvati per l'uso nei mangimi, la resistenza dei ceppi ai fluorochinoloni è rara [45]. L'uso dei fluorochinoloni nel bestiame è stato identificato come un'area critica a causa dell'importanza di questi antimicrobici nel trattamento delle infezioni umane. Nel 2017, in Europa sono state usate circa 216 tonnellate di fluorochinoloni, soprattutto negli animali destinati al consumo umano [28]. Ciò rappresenta circa il 2,4% di tutti gli antimicrobici utilizzati negli animali in Europa, mentre il totale dei fluorochinoloni utilizzati negli animali negli Stati Uniti è stato di circa 23,3 tonnellate nel 2018 [36]. Data l'importanza delle cefalosporine e dei fluorochinoloni nel trattamento degli esseri umani e nella selezione di batteri resistenti ai farmaci che possono essere trasmessi dagli animali all'uomo, l'uso di cefalosporine e fluorochinoloni deve essere limitato [39-45].

3.2.2 IMPLICAZIONI PER LA SALUTE PUBBLICA E ANIMALE

L'AMR riduce l'efficacia della terapia antimicrobica e spesso aumenta l'incidenza dei costi e la gravità delle infezioni [3,46]. Oggi è scientificamente provato che l'uso indiscriminato di antimicrobici in campo veterinario abbia portato all'emergere di batteri resistenti che causano infezioni nell'uomo, in particolare

nei ceppi di Enterococcus spp., Campylobacter spp., Salmonella spp. ed E. coli [31,42,44]. Nell'approccio One Health la resistenza alle cefalosporine è un buon esempio di come gli antibiotici svolgano un ruolo importante sia per la salute animale che per quella umana. La principale preoccupazione legata all'uso di antimicrobici utilizzati negli animali a scopo terapeutico o profilattico è la diffusione della resistenza antimicrobica [40]. I fluorochinoloni utilizzati negli animali da reddito sono associati alla resistenza ai chinoloni nei ceppi di Salmonella. La resistenza ai carbapenemici è stata osservata in ceppi di Salmonella a seguito della somministrazione di routine di ceftiofur [47,48]. L'E. coli è un importante patogeno che è una causa comune di infezioni batteriche, come enteriti e infezioni del tratto urinario e del flusso sanguigno. L'AMR è un problema in rapida crescita associato alle infezioni da E. coli negli animali e nell'uomo, e questo problema è meglio documentato negli isolati di infezioni umane, in particolare nei Paesi in via di sviluppo [49,50]. Le infezioni gravi da stafilococco nelle comunità e negli ambienti ospedalieri sono causate principalmente da ceppi di MRSA responsabili di varie infezioni (infezioni della pelle e delle ferite e batteriemia, tra le altre) [51]. S. aureus e altre specie di stafilococco colpiscono anche gli animali [52,53]. Questo batterio causa mastiti nei bovini e infezioni cutanee nei suini e negli animali domestici. I ceppi di MRSA patogeni per l'uomo sono emersi in diverse specie animali. Viene trasmesso all'uomo attraverso lo stretto contatto con animali portatori di questi ceppi [54,55].

3.2.3 APPROCCIO ONE HEALTH PER COMBATTERE LA RESISTENZA ANTIMICROBICA

L'approccio One Health fa parte dei tentativi affrontare il problema della resistenza antimicrobica a livello globale. Tra i numerosi ostacoli da superare vi sono gli interessi contrastanti di molteplici settori economici e organizzazioni coinvolte nella salute animale, umana e ambientale. Questi attori devono concordare le priorità d'azione, i modi migliori per monitorare la

resistenza antimicrobica e controllare le infezioni e le politiche che dovrebbero regolare l'uso degli antimicrobici. Ecco le strategie chiave per affrontare la resistenza antimicrobica secondo l'approccio One Health:

1. Condurre una campagna di sensibilizzazione pubblica globale per educare la società sui danni causati dall'uso eccessivo e scorretto degli antimicrobici. Delle campagne efficaci possono ridurre il numero di antimicrobici prescritti.
2. Migliorare e rafforzare le misure igieniche e prevenire la diffusione delle infezioni. Migliorando i sistemi sanitari e gli standard di vita possiamo ridurre significativamente la domanda di antimicrobici e quindi il rischio di comparsa di nuovi ceppi resistenti.
3. Ridurre l'uso non necessario di antimicrobici in agricoltura e la loro diffusione nell'ambiente. A livello globale, le maggiori quantità di antimicrobici sono consumate in agricoltura e acquacoltura. L'uso di antimicrobici come profilassi e incremento della crescita dovrebbe essere considerato pericoloso e non necessario. Inoltre, è stato documentato che gli animali espellono una percentuale significativa (75%-90%) di antimicrobici che non vengono metabolizzati e sono dispersi nell'ambiente.
4. Migliorare la sorveglianza globale della resistenza ai farmaci. La comunità medica e scientifica ha bisogno di una chiara comprensione dei dati attuali e storici sulla resistenza agli antibiotici per chiarire i nuovi meccanismi di acquisizione della resistenza, avere contezza dei casi esistenti e prevedere le minacce future. A tal fine è necessaria una migliore comprensione di tre aree: il consumo di antibiotici nell'uomo e negli animali, i tassi attuali di resistenza agli antibiotici e una migliore comprensione delle basi molecolari dell'AMR.
5. Promuovere diagnosi cliniche nuove e rapide. Le diagnosi errate effettuate negli ospedali pubblici o privati portano a prescrizioni di antibiotici non necessarie. Lo sviluppo di test

diagnostici rapidi e accurati consentirà ai medici di somministrare gli antimicrobici ai pazienti che ne hanno bisogno.

6. Promuovere lo sviluppo e l'uso di vaccini e alternative. Lo sviluppo di vaccini diretti contro i batteri resistenti agli antibiotici che causano gravi infezioni ridurrà il numero di pazienti infetti che necessitano di trattamenti antimicrobici. Attualmente sono necessari ulteriori investimenti per sviluppare nuovi vaccini e alternative agli antimicrobici, come la terapia fagica, i probiotici, gli anticorpi e le lisine.
7. Riconoscere e aumentare il numero di persone che lavorano con le malattie infettive. Affrontare la resistenza antimicrobica richiede professionisti qualificati come microbiologi, farmacisti, specialisti di malattie infettive, infermieri, specialisti del controllo delle infezioni, veterinari ed epidemiologi. A tal fine, i Paesi devono investire nella formazione di queste risorse umane.
8. Un fondo globale per l'innovazione per la ricerca in fase iniziale di nuovi trattamenti. Per sviluppare nuovi trattamenti sono necessari maggiori investimenti pubblici e privati nella ricerca sui farmaci. È necessario un fondo globale per l'innovazione per sostenere la ricerca che non ha dirette ricadute commerciali.
9. Creare migliori incentivi per promuovere gli investimenti in nuovi farmaci e nel miglioramento di quelli esistenti. Lo sviluppo di nuovi antimicrobici non è interessante per le aziende farmaceutiche perché sul mercato sono ancora presenti antimicrobici relativamente efficaci. È difficile prevedere con esattezza come e quando si svilupperà la resistenza antimicrobica, cosa che crea incertezza per le aziende farmaceutiche quando prendono decisioni commerciali.
10. Costruire una coalizione globale per un'azione reale contro la resistenza antimicrobica. L'azione su scala globale è essenziale per compiere progressi significativi nella lotta alla resistenza antimicrobica. Inserire la resistenza antimicrobica nell'agenda politica internazionale e affrontarla con l'approccio One Health è importante per ottenere un cambiamento [3].

3.3 CONCLUSIONE

Per combattere la resistenza antimicrobica è importante sostenere un approccio "One Health" (salute umana, animale, vegetale e ambientale). Ciò richiede l'accelerazione dei progressi globali, l'innovazione per garantire il futuro, la collaborazione per un'azione più efficace, l'investimento in una risposta sostenibile e il rafforzamento della governance globale e della responsabilità. La maggior parte delle classi di antibiotici è disponibile per l'uso nell'uomo e negli animali. La resistenza antimicrobica può essere ridotta se gli antimicrobici vengono utilizzati solo come trattamento, raramente per la profilassi e mai come promotori della crescita. Il successo richiederà un controllo rigoroso ed efficiente dei tipi e delle quantità di antimicrobici utilizzati nella pratica medica e il monitoraggio e il controllo della proliferazione di batteri resistenti che si diffondono nell'ambiente.

4 - RESISTENZA BATTERICA AGLI ANTIBIOTICI: I PATOGENI PIÙ CRITICI

Tratto e tradotto da
Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens 2021, 10, 1310.

https://doi.org/10.3390/pathogens10101310

Abstract

Gli antibiotici hanno reso possibile il trattamento di infezioni batteriche come la meningite e la batteriemia che, prima degli antibiotici, non erano curabili e risultavano fatali. Purtroppo negli ultimi decenni l'uso eccessivo e scorretto degli antibiotici ed alcuni fattori sociali ed economici hanno accelerato la diffusione di batteri resistenti agli antibiotici, rendendo inefficace il trattamento farmacologico. Attualmente almeno 700.000 persone nel mondo muoiono ogni anno a causa della resistenza antimicrobica (AMR). Se non emergono dei trattamenti migliori, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) prevede che questo numero potrebbe salire a 10 milioni entro il 2050, il che costituisce un problema sanitario di non secondaria importanza. Nel febbraio 2017, alla luce della crescente resistenza agli antibiotici, l'OMS ha pubblicato un elenco di patogeni che comprende i patogeni designati con l'acronimo ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species*). A questi è stato attribuito il massimo grado di "priorità" in quanto rappresentano la principale minaccia per l'uomo. La comprensione dei meccanismi di resistenza di questi batteri è un passo fondamentale per lo sviluppo di nuovi farmaci antimicrobici in grado di affrontare i batteri resistenti ai farmaci. In questa rassegna verranno esaminati l'azione degli antimicrobici comuni e i meccanismi di resistenza. Verrà anche discusso lo stato attuale della resistenza antimicrobica nei batteri resistenti più critici secondo l'elenco globale dei patogeni prioritari dell'OMS.

Parole chiave: multidrug-resistant; carbapenem-resistant; ESBL; ESKAPE.

4.1 INTRODUZIONE

Sebbene la resistenza antimicrobica (AMR) sia un processo naturale, l'emergenza di salute pubblica dovuta alla diffusione incontrollata di questo fenomeno dipende principalmente dall'uso eccessivo di antibiotici [1]. Tuttavia ci sono anche altri fattori responsabili del suo aumento [2]. Questi fattori, comunemente definiti "determinanti socioeconomici", comprendono la scarsa igiene della comunità, l'alimentazione più sicura, lo scarso controllo delle infezioni negli ospedali e nelle cliniche, l'accumulo di antibiotici nell'ambiente e il loro uso nell'industria animale e alimentare [2]. La resistenza batterica agli antibiotici è già nota da oltre 50 anni, poiché alla fine degli anni '50 la maggior parte degli isolati di *S. aureus* aveva sviluppato una resistenza alla penicillina, usata in passato per il trattamento [3]. Tuttavia, per molto tempo, la resistenza agli antibiotici non è stata una preoccupazione a livello mondiale, dato che negli anni '60 sono state sviluppate nuove classi di farmaci, come la vancomicina e la meticillina, che suggerivano una facile risoluzione del problema della resistenza tramite la sintesi di nuove molecole [4]. Purtroppo, nei decenni successivi, i batteri hanno sviluppato diversi meccanismi di resistenza agli antibiotici che li hanno protetti dagli effetti di questi farmaci e di conseguenza l'antibiotico-resistenza è progredita [5]. Nel 2017, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato per la prima volta un elenco di 12 famiglie di batteri più pericolosi per la salute umana [6]. L'elenco dell'OMS classifica i batteri in tre categorie di priorità: critica, alta e media, a seconda dell'urgenza di sviluppare nuovi antibiotici per combattere questi patogeni [7]. Gli agenti patogeni inclusi nel gruppo più critico sono i batteri multifarmaco-resistenti che rappresentano una minaccia per i pazienti negli ospedali e nelle case di cura, nonché per i pazienti le cui condizioni richiedono dispositivi medici come ventilatori e cateteri ematici

[8,9]. I batteri a priorità critica comprendono *Acinetobacter, Pseudomonas*, alcune Enterobacteriaceae come: *K. pneumoniae*, *E. coli* ed *Enterobacter spp*. [10]. Questi patogeni sono resistenti a diversi antibiotici e possono causare malattie infettive gravi e spesso fatali, come le infezioni del flusso sanguigno e la polmonite [9]. La categoria ad alta priorità comprende batteri come l'*Enterococcus faecium* e lo *Staphylococcus aureus* che sono resistenti a vari antibiotici, come la vancomicina e i fluorochinoloni. La categoria a media priorità comprende batteri come *Streptococcus pneumoniae* e *Shigella* che, sebbene possano presentare una certa resistenza, hanno antibiotici in grado di ucciderli [9,11].

Nel 2019, a causa del suo impatto sulla salute umana, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha inserito la resistenza antimicrobica (AMR) tra le dieci principali minacce alla salute globale [12].

4.2 QUALI SONO E COME FUNZIONANO I MECCANISMI DI RESISTENZA ANTIMICROBICA, IN COSTANTE AUMENTO?

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, la resistenza antimicrobica è un fenomeno naturale che si verifica quando i microrganismi non rispondono più agli antibiotici a cui erano precedentemente sensibili e che erano precedentemente attivi nel trattamento delle infezioni causate da questi microrganismi [10,12]. A seguito della resistenza ai farmaci, le infezioni diventano più difficili o impossibili da trattare, il che aumenta il rischio di diffusione di gravi malattie infettive e di morte [13,14]. Parlare di AMR come di un processo causato dall'uso eccessivo di antibiotici è una definizione poco esaustiva, poiché è noto da tempo che l'AMR si verifica naturalmente col tempo, attraverso vari meccanismi [15,16]. In altre parole, l'uso eccessivo di antibiotici nell'uomo e negli animali determina un'accelerazione di questo processo naturale, il che favorisce la diffusione dell'AMR [17,18]. Spesso si parla di batteri che diventano resistenti agli antibiotici, ma molto raramente si pensa a cosa questo significhi. In questo contesto è possibile distinguere due tipi di resistenza: naturale,

che può essere ulteriormente classificata in intrinseca e indotta, e acquisita [19]. La resistenza intrinseca si ha quando le specie batteriche sono naturalmente resistenti a determinate classi di antibiotici e ovviamente è indipendente dalla precedente esposizione agli antibiotici (ad esempio, la resistenza alla vancomicina in *Escherichia coli* e all'ampicillina, alle cefalosporine di prima e seconda generazione in *Pseudomonas aeruginosa* [19,20]). La resistenza naturale nei batteri può anche essere indotta dall'attivazione di geni in seguito all'esposizione ad antibiotici in quantità cliniche [21]. La resistenza acquisita può avvenire attraverso due processi distinti: una mutazione che si verifica nel DNA della cellula durante la replicazione, oppure il trasferimento del DNA (Figura 1). Per quanto riguarda la prima via, i ceppi mutanti sono in grado di trasferire la mutazione alla progenie attraverso la via verticale [19,22]. La seconda via prevede la trasformazione, la trasposizione e la coniugazione (definite "trasferimento genico orizzontale") (Figura 1). Nella trasformazione, il batterio ricevente assume il DNA extracellulare del donatore. Nella trasduzione, il DNA donatore avvolto da un batteriofago infetta il batterio ricevente. Nella coniugazione, il batterio donatore trasferisce il DNA al ricevente mediante accoppiamento.

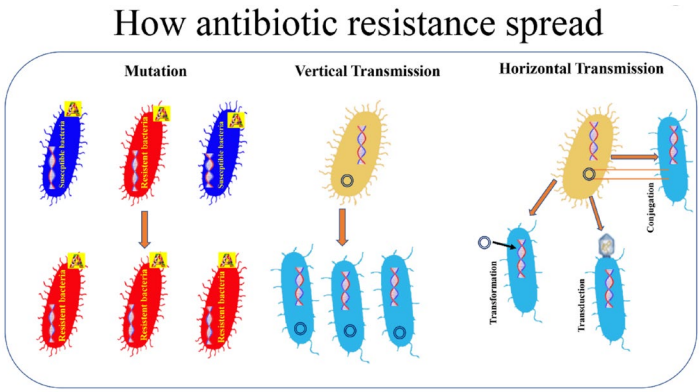


Figura 1. *Come si diffonde la resistenza agli antibiotici. La resistenza batterica agli antibiotici può essere naturale o acquisita per trasmissione verticale o orizzontale. A: antibiotico.*

Il materiale genetico resistente agli antibiotici viene quindi trasferito dai batteri resistenti agli antibiotici ai batteri non resistenti che diventano resistenti agli antibiotici [23].

4.3 COME I BATTERI ACQUISISCONO LA RESISTENZA

La rapida diffusione della resistenza antimicrobica nelle popolazioni batteriche non può essere attribuita a un unico meccanismo. Spesso è il risultato di processi complessi. È quindi necessario suddividere gli antibiotici in gruppi basati sul diverso meccanismo d'azione prima di analizzare i fattori che influenzano la resistenza a queste molecole. Sebbene esistano molte classi diverse di antibiotici, in questa rassegna abbiamo scelto di descrivere quelle maggiormente coinvolte nell'insorgenza della resistenza agli antibiotici. La Tabella 1 riassume i meccanismi d'azione e di resistenza dei principali gruppi di antibiotici. I principali meccanismi d'azione degli agenti antimicrobici, illustrati in dettaglio nella Tabella 1, comportano l'inibizione di diversi processi batterici coinvolti nella sintesi della parete cellulare, delle proteine, degli acidi nucleici e l'inibizione delle vie metaboliche. I principali meccanismi di resistenza sono: diminuzione dell'assorbimento del farmaco, alterazione del bersaglio del farmaco, inattivazione del farmaco e attivazione delle pompe di efflusso del farmaco [19,24] (Figura 2).

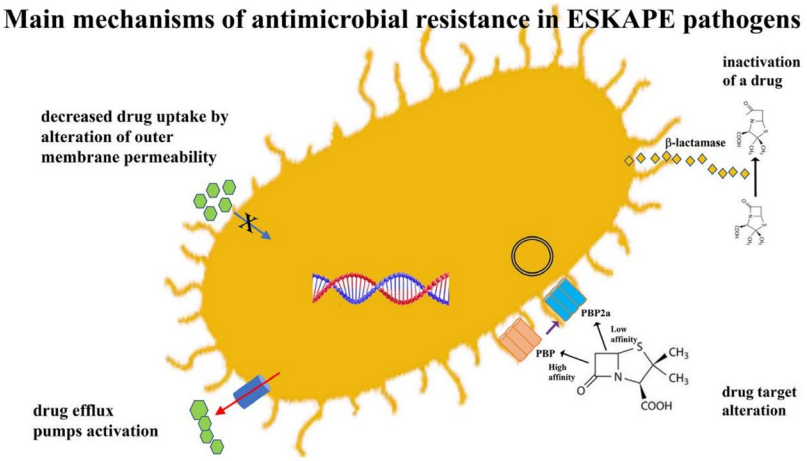


Figura 2. *Meccanismi di resistenza agli antibiotici nei patogeni ESKAPE.*

Gruppi antimicrobici	Meccanismo d'azione	Meccanismo di resistenza
β-lattami Penicilline	Inibisce la produzione di parete cellulare	Produzione di beta-lattamasi Penicillinasi
Cefalosporine Carbapenemi		Cefalosporinasi Carbapenemasi
Inibitori della β-lattamasi	Bloccano l'attività degli enzimi beta-lattamasi	Beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL)
Aminoglicosidi, cloramfenicolo Macrolidi, tetracicline	Inibiscono l'assemblaggio del ribosoma legandosi al 30S o al 50S batterico (inibiscono la sintesi proteica).	Multifattoriale (modifica enzimatica, modifica del sito bersaglio e pompe di efflusso)
Fluorochinolone	Inibiscono la replicazione del DNA	Multifattoriale (mutazioni del gene del sito bersaglio, pompe di efflusso ed enzimi modificatori)
Sulfamidici e trimetoprim	Inibiscono il metabolismo dell'acido folico	Diffusione orizzontale dei geni di resistenza, mediata da trasposoni e plasmidi, che esprimono varianti insensibili ai farmaci degli enzimi bersaglio.

Tabella 1. *Modalità d'azione e meccanismi di resistenza degli antibiotici.*

Dato che il meccanismo d'azione dei diversi antibiotici dipende in larga misura sia dalla natura della loro struttura sia dall'affinità di questi agenti per le diverse strutture batteriche, ne consegue che la conoscenza del meccanismo d'azione di questi agenti è la *conditio sine qua non* per comprendere l'emergere della resistenza a questi farmaci [25,26]. Una descrizione delle classi di farmaci antibatterici più comunemente utilizzate è disponibile nei Materiali supplementari.

In questa rassegna, la resistenza dei patogeni batterici viene discussa secondo le categorie stabilite dall'OMS [12].

4.4 I PRINCIPALI AGENTI PATOGENI RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI DIFFICILI DA TRATTARE

4.4.1 ACINETOBACTER BAUMANNII

L'Acinetobacter baumannii è un bacillo gram-negativo aerobio che appartiene al gruppo di patogeni raggruppati sotto l'acronimo "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter species*), che si riferisce alla capacità di questi batteri di sfuggire all'effetto dell'attività battericida degli antibiotici [6,27]. *A. baumannii* è un patogeno opportunista che causa infezioni nosocomiali in tutto il mondo e può sviluppare resistenza agli antibiotici attraverso diversi meccanismi quali:

1. La produzione di enzimi che degradano gli antibiotici beta-lattamici. Alla base della rapida evoluzione di questo ceppo verso la multiresistenza ci sarebbe la produzione di tutte e quattro le classi di β-lattamasi (A, B, C e D) attraverso l'incorporazione di DNA esogeno nel suo genoma [28,29]. Inoltre, in *Acinetobacter* spp. sono stati identificati sia i geni che codificano per le β-lattamasi a spettro ristretto (cioè TEM-1, SCO-1 e CARB-4) sia quelli che codificano per le ESBL (GES-11 e CTX-M) [29,30]. Come già detto,

le β-lattamasi di classe B sono metallo-β-lattamasi (MBL), hanno un ampio range di substrati e sono in grado di inibire tutti gli antibiotici β-lattamici tranne i monobattami [31]. Le β-lattamasi di classe C sono un gruppo di enzimi ad ampia diffusione solitamente resistenti alle cefamicine (cefoxitina e cefotetan), alle penicilline e alle cefalosporine [32,33]. L'*A. baumannii* possiede anche β-lattamasi di classe D o OXAs che possono idrolizzare cefalosporine e carbapenemi a spettro esteso [33,34]. Inoltre, *A. baumannii* possiede una cefalosporinasi *amp*C intrinseca [35];

2. L'espressione delle pompe di efflusso. In *A. baumannii* le pompe di efflusso sono coinvolte nella resistenza batterica a una serie di antibiotici di diverse classi chimiche, come aminoglicosidi, tetracicline, eritromicina, cloramfenicolo, trimetoprim, fluorochinoloni e diversi beta-lattami [36,37]. Diversi studi hanno dimostrato che almeno quattro classi di pompe di efflusso sono associate alla resistenza antimicrobica *di A. baumannii*: la superfamiglia dei facilitatori principali (MFS), la superfamiglia della divisione di nodulazione della resistenza (RND), la famiglia dell'estrusione di composti tossici e multifarmaci (MATE) e i piccoli trasportatori della famiglia della resistenza ai farmaci (SMR) [36,38]. Più recentemente, una sovraespressione della pompa di efflusso Ade ABC, membro della RND, è stata associata alla resistenza alla tigeciclina in *A. baumannii* [39];
3. La modificazione enzimatica degli aminoglicosidi. La modificazione enzimatica è il tipo più comune di resistenza agli aminoglicosidi [40]. Le acetiltransferasi, le adeniltransferasi e le fosfotransferasi sono tre classi di enzimi che svolgono un ruolo critico nella resistenza di *A. baumannii* agli aminoglicosidi [41]. I geni che codificano per gli enzimi modificatori degli aminoglicosidi possono essere trasferiti attraverso plasmidi e trasposoni [41].
4. La produzione di porine modificate che diminuiscono la permeabilità della membrana esterna [42,43]. In *A. baumannii* la ridotta espressione delle porine, proteine che con-

sentono il trasporto di molecole attraverso la membrana esterna, è associata alla resistenza ai carbapenemi [29,44]. Inoltre, *A. baumannii* può acquisire resistenza alla colistina, un agente antibatterico polipeptidico che ha come bersaglio l'LPS, in seguito a mutazioni dei geni coinvolti nella biosintesi dell'LPS [45,46];

5. La modifica del bersaglio dell'antibiotico [47]. In *A. baumannii* questo meccanismo di resistenza è mediato dalla sovraespressione di proteine che si legano alla penicillina, con conseguente resistenza all'imipenem, o da mutazioni della DNA girasi, che provocano resistenza ai chinoloni e alle tetracicline [29,30].

Fino a pochi anni fa, i carbapenemi come imipenem e meropenem erano gli agenti più efficaci per il trattamento delle infezioni *da A. baumannii* [48]. Questi agenti sono stati sostituiti da minociclina/tigeciclina, finché non è diventata significativa la resistenza del microrganismo a questi due agenti [48,49]. La combinazione ampicillina + sulbactam + carbapenem è la migliore terapia per il trattamento della batteriemia da *A. baumannii* MDR [50]. Anche la terapia con minociclina è efficace, sebbene siano stati registrati dei tassi significativi di resistenza [48]. Le infezioni da *A. baumannii* resistenti alla minociclina sono trattate con una combinazione di minociclina e colistina, mentre colistina/rifampicina è il trattamento più efficace per *A. baumannii* resistente alla colistina [51]. Inoltre, il trimetoprim-sulfametossazolo combinato con la colistina uccide rapidamente l'*A. baumannii* resistente ai carbapenemi [52,53]. Tuttavia, spesso vengono isolati anche ceppi resistenti a questi antibiotici. Da quanto sopra esposto, è evidente che occorre fare ogni sforzo per trovare nuovi antibiotici in grado di uccidere *A. baumannii* MDR.

4.4.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P. aeruginosa è un batterio gram-negativo aerobio comunemente presente nell'ambiente e uno dei patogeni più comuni re-

sponsabili di una serie di infezioni nosocomiali acute e croniche, tra cui gravi infezioni respiratorie in pazienti con difese dell'ospite compromesse [54,55]. In questo contesto, *P. aeruginosa* è il terzo batterio gram-negativo più comune che causa infezioni nosocomiali del flusso sanguigno [56]. *P. aeruginosa* ha mostrato una resistenza intrinseca a molti antibiotici, dovuta a diversi meccanismi di resistenza sia intrinseci che acquisiti da altri microrganismi [57,58]. I principali meccanismi di resistenza sono: sovraespressione di pompe di efflusso, diminuzione della permeabilità della membrana esterna e acquisizione o mutazione di geni di resistenza che codificano per proteine che controllano la diffusione passiva degli antibiotici attraverso la membrana esterna [59,60]. La ceftazidima e la cefepime, appartenenti rispettivamente alla terza e alla quarta generazione di cefalosporine, sono antimicrobici ad ampio spettro che hanno una copertura per *P. aeruginosa* [61]. Come *A. baumanni*, anche in *P. aeruginosa* sono state identificate tutte e quattro le principali classi di β-lattamasi (A, B, C e D) [62]. Le β-lattamasi endogene, come la AmpC β-lattamasi, possono essere indotte da diversi β-lattamici come la benzilpenicillina e l'imipenem [63]. Inoltre, *P. aeruginosa* può acquisire resistenza attraverso una mutazione genica che porta alla sovraespressione di AmpC β-lattamasi [64]. La resistenza *di Pseudomonas* agli aminoglicosidi è mediata da enzimi modificatori di aminoglicosidi (AME) trasferibili che diminuiscono l'affinità di legame con il loro bersaglio nella cellula batterica [65,66]. Il trattamento della *P. aeruginosa* MDR prevede la colistina in combinazione con un agente anti-pseudomonas come imipenem, piperacillina, aztreonam, ceftazidime o ciprofloxacina [66,67]. La resistenza ai farmaci in *P. aeruginosa* è stata trattata con successo con fosfomicina in combinazione con aminoglicosidi, cefalosporine e penicilline [63,66].

4.4.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Lo S. aureus, uno dei principali agenti patogeni per l'uomo, è un coccus gram-positivo, anaerobio facoltativo, catalasi e coa-

gulasi-positivo che tende a formare ammassi irregolari simili a grappoli d'uva [68]. Lo *S. aureus* causa infezioni da lievi a pericolose per la vita, come infezioni della pelle e dei tessuti molli, endocardite batterica, infezioni pleuropolmonari e infezioni correlate a dispositivi [69]. Questo microrganismo è un importante agente patogeno per l'uomo non solo perché è altamente contagioso e in grado di indurre infezioni croniche di lunga durata, ma anche per la sua grande capacità di sviluppare resistenza ai vecchi e nuovi antibiotici [70]. Ad esempio, circa tre anni dopo la scoperta della penicillina, è apparso uno *S. aureus* resistente alla penicillina, portatore di una beta-lattamasi codificata da un plasmide in grado di idrolizzare l'anello β-lattamico della penicillina [71]. Questo gene è trasportato su elementi trasponibili che si sono spostati in plasmidi che spesso trasportavano anche geni resistenti ad altri antibiotici come l'eritromicina e la gentamicina [71,72]. Nel 1959 è stata introdotta la meticillina, una penicillina semisintetica, per combattere le infezioni causate da batteri resistenti alla penicillina; tuttavia, già nel 1961 è stato identificato il primo ceppo di *S. aureus* resistente alla meticillina [72,73]. La meticillina e altri antibiotici β-lattamici inibiscono la crescita dello *S. aureus* legandosi alle proteine leganti la penicillina (PBP). *S. aureus* è diventato resistente alla meticillina (MRSA) acquisendo, tramite trasferimento genico orizzontale, i geni *mecA* e *mecC* che inattivano la meticillina attraverso la sintesi di una PBP alternativa, denominata PBP2a, che ha un'affinità molto bassa per quasi tutti gli antibiotici β-lattamici [73,74]. Per molti anni la vancomicina è stata considerata un antibiotico di ultima istanza contro MRSA gravi e altre infezioni resistenti da gram-positivi [75]. Tuttavia, alla fine degli anni '80 la resistenza alla vancomicina è comparsa prima negli enterococchi (VRE) e negli ultimi anni nello *S. aureus* (VRSA) [76]. Il meccanismo di resistenza di VRSA è mediato dall'operone *VanA* trasportato dall'elemento genetico mobile Tn1546 acquisito da *Enterococcus* resistenti alla vancomicina [77,78]. Nel 1997 è stato riportato il primo isolato clinico di *S. aureus* vancomicina-intermedio (VISA) che non viene inibito in vitro a concentrazioni di vancomicina inferiori a

4-8 µg/mL. Al contrario, lo *S. aureus* resistente alla vancomicina (VRSA) viene inibito solo a concentrazioni di 16 µg/mL o superiori [77]. VISA e VRSA sono emersi da MRSA; tuttavia, VRSA non progredisce da VISA perché entrambi hanno meccanismi di resistenza diversi [79].

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la patogenicità e la resistenza agli antibiotici di *S. aureus* rappresentano una grave minaccia per la salute umana in tutto il mondo [10]. MRSA, VISA e VRSA sono riconosciuti come alcuni dei principali agenti patogeni delle infezioni acquisite in ospedale e sono considerati ad alta priorità poiché, senza soluzioni terapeutiche e di contenimento efficaci, potrebbero causare gravi infezioni impossibili da controllare su scala globale [80]. Le infezioni da MRSA sono di solito difficili da trattare e quindi nell'ultimo decennio sono state utilizzate diverse classi di antibiotici per trattare queste infezioni che hanno contribuito all'emergere e alla diffusione di ceppi MDR [71,80,81]. Negli MRSA la resistenza a un singolo agente antimicrobico o a diverse classi di antibiotici avviene attraverso l'attivazione di diversi meccanismi, quali (1) mutazioni nei geni bersaglio (ad esempio, la resistenza ai fluorochinoloni è dovuta a mutazioni nei geni *gyrA* e *gyrB* del topoisomerse II); (2) alterazioni del bersaglio; (3) sovraespressione della pompa di efflusso (pompa NorA) [71]. La daptomicina, un antibiotico peptidico ciclico con una catena laterale di acidi grassi che si lega alla membrana citoplasmatica batterica in presenza di ioni calcio, è un'importante alternativa alla vancomicina per il trattamento di pazienti con infezioni causate da MRSA [82]. Tuttavia, sebbene la resistenza alla daptomicina in *S. aureus* non sia comune, la resistenza a questo farmaco durante la terapia è in aumento a causa di mutazioni di diverse proteine che determinano un ridotto legame del farmaco al suo sito bersaglio [28,29]. Inoltre, *S. aureus* è ben noto per la sua capacità di acquisire resistenza ad altri antibiotici, come il trimetoprim-sulfametossazolo e le tetracicline, attraverso i diversi meccanismi di resistenza sopra menzionati [72]. Poiché sono stati osservati degli alti tassi di resistenza nei pazienti che hanno

ricevuto trattamenti prolungati di acido fusidico o rifampicina in monoterapia, un'opzione razionale per le infezioni cutanee da *S. aureus* è la terapia combinata [71,83]. Negli ultimi anni, a causa dell'aumento del tasso di infezioni da MRSA, si è assistito a un rinnovato interesse per l'uso di agenti macrolidi-lincosamide-streptogramina (MLS) per il trattamento di tali infezioni [71,84].

Date le eccellenti proprietà farmacocinetiche della clindamicina (cioè clearance, emivita di eliminazione, ampia penetrazione tissutale), questo antibiotico lincosamidico è l'agente preferito per il trattamento di infezioni gravi, comprese quelle causate da *S. aureus* resistente ai macrolidi e MRSA. Tuttavia, si segnala spesso che la resistenza alla clindamicina è in aumento anche tra i ceppi di MRSA associati all'assistenza sanitaria. La resistenza alla MLS è dovuta a tre meccanismi principali: modifica del bersaglio, efflusso attivo e inattivazione enzimatica dell'antibiotico [85]. Tra questi, il meccanismo di modifica del bersaglio ribosomiale mediato dai *geni erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC* e ermF) è il meccanismo principale [85].

Questi geni codificano per delle metiltransferasi che modificano il sito bersaglio ribosomiale bloccando il legame dell'antibiotico e conferendo una resistenza costitutiva e inducibile [86]. La resistenza inducibile si sviluppa quando è presente un induttore macrolidico adatto (ad esempio, l'eritromicina) delle metiltransferasi. Questi ceppi sono resistenti all'eritromicina e falsamente sensibili alla clindamicina in vitro. [86].

Tuttavia, se il ceppo è resistente all'eritromicina, è possibile che durante la terapia con clindamicina vengano selezionati mutanti resistenti alla clindamicina e che i pazienti non rispondano clinicamente alla clindamicina a causa di un'alterazione del target ribosomiale. La resistenza inducibile alla clindamicina può essere rilevata con i dispositivi standard di test di suscettibilità automatizzati o, in alternativa, deve essere rilevata con il test di diffusione a doppio disco (D-test) [86,87]. Le infezioni causate da un ceppo MRSA con un D-test positivo non devono essere trattate con la clindamicina [73].

4.4.4 POLMONITE DA KLEBSIELLA

K. pneumoniae è un membro della famiglia Enterobacterales, bacillo gram-negativo non fastidioso e di norma incapsulato [8]. *K. pneumoniae* può causare diversi tipi di infezioni nosocomiali e acquisite in comunità, tra cui infezioni del tratto urinario, polmonite, ascesso epatico, infezioni del sito chirurgico e infezioni del flusso sanguigno, soprattutto nei pazienti immunocompromessi [88,89]. Poiché il batterio non si diffonde attraverso l'aria, per contrarre un'infezione *da Klebsiella* è necessario il contatto da persona a persona [90]. La *Klebsiella* è diventata altamente resistente agli antibiotici grazie all'acquisizione diffusa di geni che codificano enzimi, come le ESBL e le carbapenemasi [91]. I ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi sono le Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE) più importanti dal punto di vista clinico [92]. I carbapenemi sono spesso l'ultima linea di difesa contro le infezioni persistenti da gram-negativi, di conseguenza la crescente prevalenza di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi (*KPC*) che ospitano il gene *blaKPC-3* codificante la carbapenemasi, rappresenta una grave minaccia per la salute pubblica [93,94].

4.4.5 ENTEROBACTER SPP.

Le specie di *Enterobacter* sono bacilli gram-negativi aerobi mobili appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Il *complesso Enterobacter cloacae* (ECC) comprende diversi patogeni, in grado di produrre un'ampia varietà di infezioni, i più frequenti dei quali sono *Enterobacter cloacae* ed *Enterobacter aerogenes* [95]. Nel 2019, *E. aerogenes* è stato riclassificato come *Klebsiella aerogenes* a causa della sua maggiore somiglianza genotipica con il genere *Klebsiella* [96]. Le specie di *Enterobacter* sono bastoncini gram-negativi non fastidiosi, talvolta incapsulati [97]. Possono causare infezioni opportunistiche in pazienti immunocompromessi, solitamente ospedalizzati, avendo acquisito un'ampia gamma di meccanismi di resistenza agli antibiotici [96]. Molti ceppi di *Enterobacter* producono ESBL e carbapenemasi, tra cui VIM, OXA,

metallo-β-lattamasi-1 e KPC [34]. Inoltre, in questo gruppo batterico, un ruolo importante nello sviluppo della resistenza agli antibiotici è rappresentato dalla depressione permanente delle β-lattamasi ampC, che possono essere espresse ad alti livelli. [98]. Questi ceppi MDR sono resistenti a quasi tutti i farmaci antimicrobici disponibili, ad eccezione della tigeciclina e della colistina [8,99]. Inoltre, un recente report indica che è emersa anche una *K. aerogenes* pan-resistente ai farmaci, che mostra resistenza all'antibiotico di ultima istanza, la colistina [7]. A complicare ulteriormente il trattamento delle infezioni batteriche, *K. aerogenes* è in grado di ospitare sottopopolazioni di batteri resistenti alla colistina che non sono rilevabili con le attuali strategie di test diagnostici [100].

4.4.6 ENTEROCOCCHI

Gli enterococchi sono cocchi gram-positivi, anaerobi facoltativi commensali gastrointestinali in grado di persistere in una serie di ambienti stressanti e ostili [101]. Sebbene siano state descritte più di 50 specie diverse di enterococchi, nell'uomo solo due specie causano la maggior parte delle infezioni da enterococco: *E. faecalis* e *E. faecium* [101]. *E. faecalis* è la specie più patogena, anche se *E. faecium* è più resistente a molti agenti antimicrobici e, soprattutto negli ospiti immunocompromessi, può causare grave morbilità e mortalità [101,102]. Questi microrganismi sono tipicamente innocui negli individui sani, mentre nei pazienti immunocompromessi sono coinvolti in infezioni nosocomiali come le infezioni delle vie urinarie associate a catetere, le endocarditi e le batteriemie [102]. Gli enterococchi stanno diventando sempre più resistenti agli agenti antimicrobici e ciò è dovuto principalmente a: (1) largo uso negli ospedali di antibiotici ad ampio spettro (penicilline e cefalosporine), che favorisce la colonizzazione intestinale di *E. faecium* aumentando notevolmente il normale microbiota intestinale gram-negativo (le PBP mutate e la sovraespressione degli enzimi β-lattamasi portano ad alti livelli di resistenza agli antibiotici β-lattamici) [103]; (2) resistenza intrinseca

degli enterococchi a diversi antibiotici comunemente usati [104]; (3) capacità di questi ceppi di acquisire e diffondere determinanti di resistenza agli antibiotici [104]. In *E. faecium* sono state identificate almeno tre diverse vie coinvolte nella resistenza alle cefalosporine [103,104]. Negli anni '70 è stata introdotta la vancomicina per contrastare la diffusione di enterococchi resistenti alle cefalosporine di terza generazione [105]. Poi, negli anni '90, a causa dell'uso massiccio della vancomicina, gli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) sono emersi come il secondo patogeno nosocomiale più comune [104,105]. *E. faecium* può acquisire geni attraverso elementi genetici mobili come plasmidi e trasposoni (ad esempio, la resistenza alla vancomicina può essere trasferita dal cluster genico *vanA* sul trasposone *Tn1546*) [106]. La vancomicina agisce colpendo la terminazione D-alanil-D-alanina del peptidoglicano inibendo la sintesi della parete cellulare [107]. La resistenza alla vancomicina è mediata da diversi gruppi di geni *van*, come *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX* e *vanZ*, responsabili della sostituzione dei terminali D-Ala-D-Ala con D-alanil-D-lattato. La vancomicina si lega a d-Ala-d-Lac molto più debolmente rispetto al normale prodotto dipeptidico, con conseguente bassa affinità di legame della vancomicina [106]. Il gruppo di geni *Van A* è il tipo più comune ed è stato localizzato su un trasposone di 10.581 bp (*Tn1546*) di *E. faecium* [108].

E. faecium è considerato un batterio MDR in quanto è intrinsecamente resistente agli aminoglicosidi come tobramicina, kanamicina, gentamicina, dato che è in grado di produrre enzimi modificanti gli aminoglicosidi (AME), tra cui le aminoglicosidi nucleotidiltransferasi (ANTs), le aminoglicosidi acetiltransferasi (AACs) e le aminoglicosidi fosfotransferasi (APHs) [109]. Inoltre, delle mutazioni all'interno del gene *rpsL*, che codifica la proteina ribosomiale S12, possono determinare una resistenza di alto livello alla streptomicina [106,109]. Inoltre, la resistenza ai fluorochinoloni di alto livello in *E. faecium* è più frequentemente legata a mutazioni puntiformi nei geni *gyrA* e *parC*, che codificano le subunità A della DNA girasi e della topoisomerasi IV, o al trasportatore di efflusso *NorA* che pompa questi farmaci [106].

4.5 CONCLUSIONI

Si definisce "resistenza agli antibiotici" la capacità dei batteri di resistere all'esposizione agli antibiotici progettati per ucciderli o inibirne la crescita. Sebbene la resistenza agli antibiotici sia un processo naturale dovuto a cambiamenti genetici nei batteri in seguito all'esposizione agli antibiotici, questo fenomeno viene accelerato dall'uso eccessivo e scorretto degli antibiotici. L'uso eccessivo di antibiotici provoca l'uccisione dei batteri sensibili e permette ai batteri resistenti ai farmaci di proliferare. Le carenze igieniche, lo scarso controllo delle infezioni e l'uso di antibiotici negli animali da allevamento sono tra le cause principali della diffusione della resistenza antimicrobica. Inoltre, esistono dei meccanismi di resistenza nuovi e spesso non riconosciuti che contribuiscono ulteriormente alla resistenza ai farmaci, come l'eteroresistenza (HR) e la concentrazione di prevenzione mutante (MPC). Il primo di questi due fattori può essere definito come la resistenza a determinati antibiotici da parte di una sottopopolazione preesistente di cellule resistenti, all'interno di una popolazione più ampia di microrganismi sensibili agli antimicrobici [110]. Questa sottopopolazione di cellule resistenti può replicarsi rapidamente in presenza di un determinato antibiotico, mentre i microrganismi sensibili vengono uccisi. Dei report recenti indicano che l'eteroresistenza è molto comune per diverse specie batteriche e classi di antibiotici [110]. La seconda, nota come MPC, rappresenta una soglia al di sopra della quale ci si aspetta che la proliferazione selettiva di mutanti resistenti avvenga solo raramente [111]. Tradizionalmente, la concentrazione minima inibitoria (MIC) è stata ampiamente utilizzata per determinare la suscettibilità e la resistenza dei batteri agli antimicrobici. Tuttavia, la MIC rappresenta un parametro della resistenza, ma non tutti. A causa di mutazioni spontanee, anche dopo l'esposizione delle cellule a un antibiotico a livelli di MIC, spesso rimane una sottopopolazione di mutanti resistenti agli antibiotici. Aumentando la concentrazione dell'antibiotico al di sopra della MIC si otterrà un valore che ucciderà tutti i mutanti [112]. Questa

concentrazione è l'MPC, che può essere definita come MIC del mutante meno sensibile, con un singolo passaggio. In questo contesto, è essenziale determinare il rapporto MPC/MIC per prevenire la comparsa di mutanti.

I patogeni ESKAPE sono batteri letali con proprietà di resistenza multifarmaco in rapida crescita. Sebbene questi batteri siano geneticamente diversi, le strategie di resistenza che sono alla base dell'emergere e della persistenza di questi patogeni sono ampiamente condivise: abbiamo la diminuzione dell'assorbimento dei farmaci, l'alterazione del bersaglio dei farmaci, l'inattivazione dei farmaci e l'attivazione delle pompe di efflusso dei farmaci. Per limitare la diffusione dei patogeni ESKAPE e, più in generale, della resistenza agli antibiotici, è diventato imperativo prestare maggiore attenzione alla sorveglianza e alla stewardship antimicrobica sia nella salute umana che negli animali da reddito. Questi programmi, insieme allo sviluppo di nuovi antibiotici o di nuovi approcci (ad esempio, l'inibizione della formazione di biofilm e la terapia con batteriofagi), sono probabilmente l'unico modo per rallentare la diffusione di ceppi multiresistenti a livello mondiale.

5 - DEFINIRE LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI: VERSO UN'ARMONIZZAZIONE INTERNAZIONALE

Tratto e tradotto da
Kahlmeter G., *Defining antibiotic resistance-towards international harmonization*, Upsala Journal of Medical Sciences, 2014, 2, 119, 78-86

doi: 10.3109/03009734.2014.901446

Abstract
I test di suscettibilità antimicrobica con metodi fenotipici prevedono dei punti di rottura, cioè una concentrazione minima inibitoria (MIC) che categorizzi i microrganismi in suscettibili, suscettibili in modo intermedio e resistenti all'agente antimicrobico in questione. La determinazione dei *breakpoint* richiede strumenti quali la comprensione del dosaggio, la distribuzione delle MIC di organismi senza meccanismi di resistenza, la farmacocinetica, la farmacodinamica e l'esito clinico in situazioni cliniche definite. Diversi Paesi europei (Francia, Germania, Norvegia, Svezia, Paesi Bassi e Regno Unito) dispongono di comitati nazionali per i *breakpoint*, spesso con 20-30 anni di esperienza e tradizione. Questi comitati collaborano ora sotto l'egida del Comitato europeo per i test di suscettibilità antimicrobica (EUCAST), organizzato dalla Società europea di microbiologia clinica e malattie infettive (ESCMID) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC). Insieme all'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), EUCAST determina i *breakpoint* per gli agenti antibatterici e antimicotici esistenti e nuovi. Inoltre, EUCAST ha sviluppato un metodo di diffusione su disco per i test di suscettibilità antimicrobica che ora, insieme ai nuovi *breakpoint* europei, viene usato in molti Paesi sia all'interno che all'esterno dell'Europa.

5.1 INTRODUZIONE

I test di suscettibilità antimicrobica (AST) di batteri e funghi vengono eseguiti per prevedere l'esito della chemioterapia antimicrobica delle infezioni nei pazienti, per determinare l'epidemiologia locale della resistenza antimicrobica e costituire una base per la terapia empirica, per individuare e quindi fornire opportunità per prevenire la diffusione di organismi portatori di meccanismi di resistenza particolarmente indesiderati (controllo delle infezioni e salute pubblica), nonché per misurare il tasso di sviluppo della resistenza e correlarlo alle attività che possono aumentarne o ridurne lo sviluppo.

5.2 MISURAZIONE DELLA SUSCETTIBILITÀ DEI MICRORGANISMI

La sensibilità dei microrganismi può essere misurata con metodi fenotipici e/o genotipici. I metodi fenotipici, come la determinazione del valore della concentrazione minima inibente (MIC) di un agente antimicrobico per l'organismo, possono prevedere sia la sensibilità che la resistenza, mentre i metodi genotipici prevedono solo la resistenza. Con i metodi fenotipici si possono quantificare la resistenza e la sensibilità. Un organismo inibito o ucciso da una concentrazione molto bassa dell'agente è classificato come più sensibile di uno che non viene inibito o ucciso nemmeno da una concentrazione elevata. Quest'ultimo sarà sicuramente classificato come clinicamente resistente, mentre decidere come classificare gli organismi senza meccanismi di resistenza o con una resistenza di basso livello è molto più complesso. A tal fine è necessario riunire formalmente degli esperti (un comitato di *breakpoint*) con competenze in microbiologia, malattie infettive, farmacologia e farmacodinamica. Dopo un periodo di fioritura delle iniziative individuali, alcuni colleghi hanno preso in mano la situazione. Tra i padri fondatori dei test di suscettibilità abbiamo Ericsson e Sherris (1) e Bauer e

collaboratori (2). La molteplicità di iniziative private ha creato un problema: i sistemi sviluppati in Francia, Germania, Paesi Bassi, Svezia, Regno Unito, Stati Uniti e Norvegia sono tutti stati sviluppati in direzioni leggermente diverse. Abbiamo:

- BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Regno Unito; http://www.bsac.org.uk).
- CA-SFM (Comité de l'ántibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Francia; http://www.sfm.asso.fr).
- CLSI, originariamente NCCLS (Clinical Laboratory Standards Institute, USA; http://www.clsi.org).
- CRG (Commissie Richtlijnen Gevoeligheids-bepalingen, Paesi Bassi).
- DIN (Deutsches Institut für Normung, Germania).
- NWGA (Norwegian Working Group on Antibiotics, Norvegia; http://www.unn.no/category10274.html).
- SRGA e SRGA-M (Swedish Reference Group of Antibiotics, Svezia, e il suo sottocomitato sulla metodologia; http://www.srga.org).

La concentrazione che separa i microrganismi sensibili da quelli non sensibili è chiamata S-*breakpoint* ed è espressa come S≤X mg/L (dove X è un valore di MIC), mentre la concentrazione che separa gli organismi resistenti da quelli non resistenti (ad esempio, sensibili o sensibili in modo intermedio) è chiamata R-*breakpoint* ed è espressa come R>Y mg/L (dove Y può essere lo stesso valore di MIC o un valore superiore a X). Solo per caso le commissioni si sono accordate su un *breakpoint*. La Tabella I mostra i *breakpoint* di cefotaxime e gentamicina per le *Enterobacteriaceae* prima di qualsiasi sforzo di armonizzazione. Entrambe illustrano le sorprendenti differenze tra i comitati nelle definizioni dei *breakpoint*. La colonna di destra mostra l'effetto dei *breakpoint* diversi sulla misurazione della resistenza alla gentamicina in *Escherichia coli*. A seconda del *breakpoint* utilizzato, la resistenza sarà riportata come un tasso compreso tra l'1,9% e il 14,3%. Si noti inoltre che ciò che è considerato resistente (R) da

una commissione potrebbe essere classificato come sensibile (S) da un'altra commissione.

	E. coli contro cefotaxime	E. coli contro gentamicina	%R in EARSSa
	S≤/R>	S≤/R>	
BSAC (Regno Unito)	2/2	1/1	14.3%
CA-SFM (Francia)	4/32	4/8	1.9%
CRG (Paesi Bassi)	4/8	1/4	3.3%
DIN (Germania)	2/8	1/4	3.3%
NCCLS (CLSI) (USA)	8/32	4/4	3.3%
NWGA (Norvegia)	1/2	2/4	3.3%
SRGA (Svezia)	0.5/1	2/2	8.1%
EUCAST	1/2	2/4	3.3%

Tabella 1. *Differenze nei breakpoint misurati da sette comitati diversi, prima del processo di armonizzazione.*

I comitati nazionali in Europa erano seguiti, con poche eccezioni, solo da connazionali. Ogni Paese dedicava molto tempo allo sviluppo e al mantenimento dei propri sistemi. Le 2-4 riunioni annuali di ciascun comitato erano a porte chiuse e coinvolgevano i 10-15 membri del comitato. Quasi tutti i comitati hanno sviluppato non solo i *breakpoint*, ma anche un metodo di diffusione del disco più o meno unico per ognuno.

Il metodo si è sviluppato in diverse direzioni – metodo che prevede il posizionamento di dischi di carta contenenti antibiotici (anche se sono stati provati altri materiali) su una piastra di agar inoculata e la lettura del diametro delle zone di inibizione come misura surrogata della MIC. I comitati europei hanno basato i loro metodi di diffusione su disco sull'International Collaborative Study (1), e tutti hanno utilizzato un inoculo semi-confluente, ma con terreni diversi. Negli Stati Uniti è stato costituito l'NCCLS (poi CLSI), che ha basato le proprie

raccomandazioni sulle pubblicazioni di Bauer et al. (2), in cui si raccomandava un inoculo confluente. Le raccomandazioni del CLSI sono state ampiamente utilizzate anche al di fuori degli Stati Uniti. Il CLSI si riunisce due volte l'anno ed è composto da 12 membri votanti e 12 consulenti. Dal 2002 l'autore è il consulente europeo. I membri votanti provengono dalla professione medica, da agenzie governative, come il Centro per il controllo delle malattie (CDC), e dal settore privato, sia dall'industria farmaceutica che da quella che produce materiale AST. Le riunioni sono tradizionalmente aperte a tutti e la sala riunioni è spesso affollata di spettatori interessati a seguire i lavori, per lo più dal mondo industriale.

Di fatto, fino al 2002, il mondo aveva almeno sette sistemi interpretativi diversi per testare la sensibilità dei batteri agli antibiotici. Il confronto dello sviluppo della resistenza antimicrobica era spesso difficile, a meno che non si confrontassero i tassi di stafilococco aureo resistente alla meticillina (MRSA), gli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE), l'*Haemophilus influenzae* produttore di beta-lattamasi, le *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e pochi altri, per i quali i *breakpoint* e la metodologia fenotipica non erano critici. Questo perché sono stati utilizzati test surrogati o perché è stata utilizzata la microbiologia molecolare per rilevare il gene della resistenza. Nonostante queste differenze e carenze, ci sono stati solo deboli tentativi di unire i comitati e nessuno ha avuto l'autorità di intraprendere azioni concrete.

5.3 LA NASCITA DEL COMITATO EUROPEO PER I TEST DI SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA

Nel 1997, la Società europea di microbiologia clinica e malattie infettive (ESCMID) ha costituito il Comitato europeo per i test di suscettibilità antimicrobica (EUCAST). Inizialmente il comitato è stato istituito senza il coinvolgimento dei sei comitati nazionali europei. Ben presto è apparso evidente che, con questa impostazione, non si sarebbe potuta raggiungere l'armonizzazio-

ne dei *breakpoint*: al posto di un comitato europeo, vi erano ora sette comitati attivi in Europa.

Nel 2001, all'autore è stato chiesto di dedicare del tempo a determinare se fosse possibile formare un comitato per i *breakpoint* veramente europeo con il compito di armonizzare i *breakpoint* in Europa. A quel punto EUCAST era un'operazione costosa per l'ESCMID e, a meno che non ci fosse un piano valido per raggiungere un accordo europeo sugli AST, l'ESCMID voleva chiudere il comitato. Con una certa trepidazione per il carico di lavoro e gli spostamenti da fare, e solo perché il segretario scientifico Derek Brown (Cambridge, Regno Unito) accettò di occuparsene, si giunse a un accordo. Nel corso di 12 mesi sono stati visitati i sei comitati europei e sono stati discussi la necessità e i vantaggi di un sistema di *breakpoint* europeo comune. L'organizzazione proposta non avrebbe necessariamente interferito con lo sviluppo dei sistemi nazionali di diffusione dei dischi (erano presenti test di BSAC, CA-SFM, CRG, DIN e SRGA). Alla fine, tutti e sei i comitati si sono impegnati nella causa comune. Si è definita una modalità con cui i sei comitati nazionali europei avrebbero potuto mantenere la loro struttura e importanza nazionale, ma lavorando insieme. Ogni comitato è rimasto e tutti hanno avuto un rappresentante in un comitato congiunto. Tuttavia i *breakpoint* non sarebbero stati decisi se non insieme agli altri comitati. È stato creato un comitato direttivo, con un presidente e un segretario scientifico (e successivamente un coordinatore dei dati clinici), un rappresentante di ciascun comitato nazionale e due rappresentanti di altri Paesi europei. È stato inoltre istituito un Comitato generale, con rappresentanti di tutti i Paesi europei (e successivamente di altri Paesi), e sono stati concordati gli statuti. I comitati nazionali hanno firmato dei contratti che li vincolavano al lavoro da svolgere. Tuttavia, il Comitato esecutivo dell'ESCMID ha esitato, poiché si riteneva che molti paesi europei seguissero il CLSI e che forse non era necessario creare un sistema europeo. I comitati nazionali per i *breakpoint* hanno chiarito che l'adozione delle raccomandazioni CLSI non era accettabile e hanno sottolineato che l'Europa non aveva alcuna influenza sul

processo di determinazione dei *breakpoint* CLSI e che l'influenza dell'industria era marcata e inaccettabile per gli europei. Inoltre, i sistemi europei erano tutti liberamente disponibili per gli utenti e non sarebbe stato possibile consigliare ai laboratori di seguire le raccomandazioni. Con qualche esitazione, l'ESCMID ha accettato i piani e ha deciso di fornire fondi per il lavoro del comitato EUCAST. A EUCAST è stato consigliato di cambiare l'acronimo del comitato. Il consiglio non è stato seguito e il comitato rimase EUCAST, con la speranza che venisse riconosciuta comunque la sua nuova funzione. Alla fine, sono stati richiesti e ottenuti fondi dall'UE (Programma di sanità pubblica della Commissione europea del 2003) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) (Accordo quadro di partenariato tra ECDC ed ESCMID/EUCAST nel 2008 e successivamente in risposta a diversi bandi di gara fino al 2014 incluso) e da allora ECDC, ESCMID e i comitati nazionali per i *breakpoint* hanno condiviso l'onere di EUCAST. Il rinnovato Comitato direttivo di EUCAST si è messo al lavoro (3).

5.4 STRUMENTI PER LA DETERMINAZIONE DEI BREAKPOINT

La determinazione dei *breakpoint* richiede degli strumenti. Cinquant'anni fa i *breakpoint* erano basati sulle MIC e sulle concentrazioni sieriche. Tutte le specie avevano lo stesso *breakpoint* per un agente antimicrobico. Oggi le indicazioni d'uso sono specifiche e i *breakpoint* vengono assegnati solo a delle specie definite. Sono finiti i tempi in cui a un agente venivano assegnati *breakpoint* per "infezioni causate da batteri sensibili all'agente". Oggi i *breakpoint* sono rispecchiati da importanti meccanismi di resistenza e quella che era la farmacocinetica in 10 volontari sani è ora costituita da volontari e pazienti e dalla varianza simulata in popolazioni di 10.000 o più persone. Gli strumenti si sono sviluppati (Tabella II) e quella che era un'arte è ora un'arte basata sulla scienza.

Strumento, informazione	Risultato
Dose	Definizione della dose normale (più comune) e della dose massima per la quale i *breakpoint* sono validi.
Indicazioni cliniche	Indicazioni cliniche per le quali esiste una ragionevole evidenza clinica e per le quali i *breakpoint* sono validi.
Specie target	Specie per le quali esiste una ragionevole evidenza clinica e per le quali i *breakpoint* sono validi.
Distribuzioni di MIC per le specie target per definire i valori di cut-off epidemiologici (ECOFF).	Valore di cut-off epidemiologico (ECOFF). Le distribuzioni di MIC definite sono disponibili sul sito web di EUCAST e la determinazione dell'ECOFF per le specie in cui sono stati ottenuti valori di MIC sufficienti. L'importanza di questo aspetto è che il *breakpoint* clinico finale non deve dividere le distribuzioni di MIC wild-type di importanti organismi bersaglio. Ciò impedirebbe la riproducibilità dei test di suscettibilità.
Meccanismi di resistenza negli organismi bersaglio	Quando esiste un'ovvia correlazione tra la presenza di un meccanismo (o gene) di resistenza definito, il *breakpoint* deve separare gli organismi senza e con il meccanismo (gene) di resistenza. Quando la correlazione è più forte con la MIC dell'organismo che con la presenza o l'assenza di un meccanismo di resistenza, il *breakpoint* dovrebbe essere autorizzato a dividere gli organismi senza e con il meccanismo (gene).
Farmacocinetica dell'agente; Farmacodinamica dell'agente; Simulazioni matematiche.	Valore di cut-off PK/PD.
Dati sull'esito clinico (se correlati alla MIC): per determinare se i tassi di successo clinico sono correlati alle MIC o a specifici meccanismi di resistenza.	Valore clinico di cut-off.

Tabella 2. *Strumenti e informazioni necessari, secondo EUCAST, per la determinazione dei breakpoint.*

I valori di cut-off epidemiologici (ECOFF), i cut-off PK/PD e i cut-off clinici definiranno insieme un *breakpoint* clinico. Il ruolo della farmacocinetica e della farmacodinamica nella definizione dei *breakpoint* EUCAST è stato pubblicato di recente (4).

5.5 DISTRIBUZIONE DELLE MIC DEI BATTERI E DEI FUNGHI FENOTIPICAMENTE WILD-TYPE

Al Comitato Direttivo EUCAST sono stati mostrati i diagrammi di distribuzione delle MIC dei batteri fenotipicamente wild-type utilizzati dall'SRGA alla fine degli anni '80. È stato deciso che le discussioni sui *breakpoint* all'interno del comitato non potevano basarsi su distribuzioni di MIC uniche portate al tavolo da un singolo individuo o da un comitato nazionale. 15 anni fa non c'era accordo sui metodi e ogni comitato sosteneva il proprio. La differenza di fatto tra i metodi non era ben nota.

È stato sviluppato un prototipo basato sul web per raccogliere un gran numero di distribuzioni di MIC da molte fonti internazionali. Sono state ottenute molto rapidamente grandi quantità di valori di MIC o di contributi spontanei da parte di ricercatori di tutto il mondo. Oggi nel database sono presenti più di 25.000 contributi, tutti sotto forma di distribuzioni di MIC, e alcune distribuzioni di agenti/specie sono costituite da 50 contributi individuali e più di 50.000 valori di MIC. Le MIC provengono dalla medicina umana e veterinaria, da ampi studi di sorveglianza, da progetti scientifici, da programmi di sicurezza alimentare e da studi clinici. Sono presenti anche distribuzioni di antimicotici nelle specie *Candida* e *Aspergillus*. Il sito web, liberamente consultabile, viene visitato ogni anno da oltre 100.000 persone (http://www.eucast.org/mic_distributions/). Nella prima pagina del sito, che spesso sfugge agli utenti, si trova una descrizione di come sono stati ottenuti i contributi. Su queste distribuzioni wild-type di valori di MIC specie-specifici provenienti da molte fonti, EUCAST ha determinato il valore di cut-off epidemiologico agente/specie-specifico (ECOFF). Questi valori sono ora uti-

lizzati in molti programmi diversi, in medicina umana, medicina veterinaria e sicurezza alimentare. La maggior parte degli ECOFF è stata determinata utilizzando il "metodo eyeball", ma sono stati sviluppati anche metodi statistici per calcolare l'ECOFF (5). Le Figure 1,2,3 mostrano alcuni grafici tipici (esemplificati per la ciprofloxacina) tratti dal sito web della MIC e della distribuzione delle aree di inibizione, mentre la Figura 4 mostra un grafico tratto dal sito web di EUCAST "calibrazione e validazione".

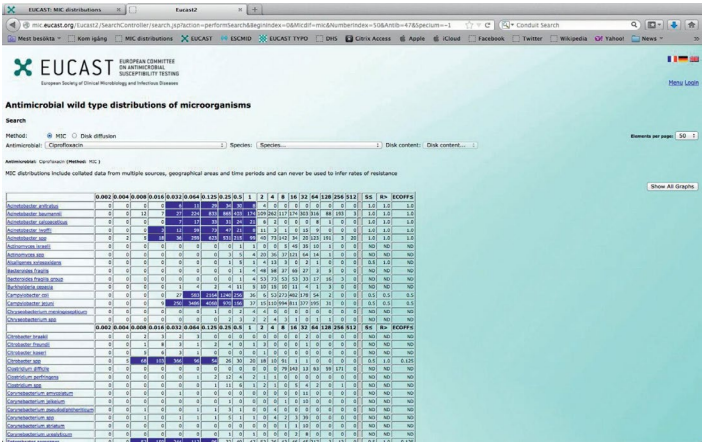


Figura 1. ***Distribuzioni delle MIC di ciprofloxacina dell'EUCAST dal sito web dell'EUCAST.*

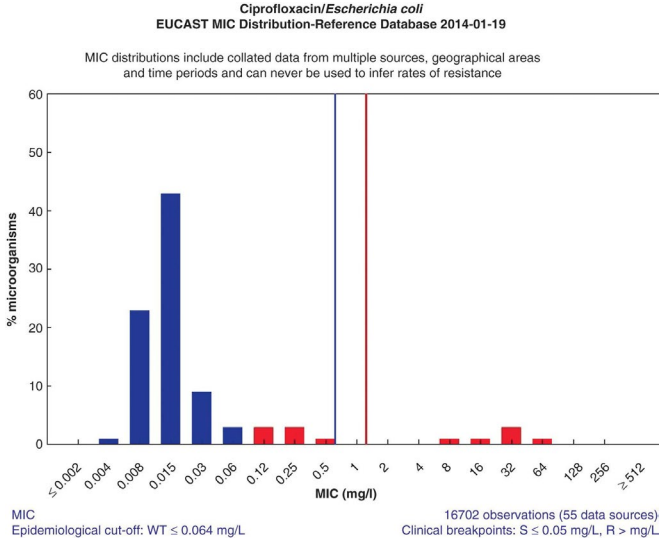


Figura 2. *Distribuzione della MIC della ciprofloxacina di *E. coli* dal sito web EUCAST, come risultato del clic su "E. coli" nella Figura 1.*

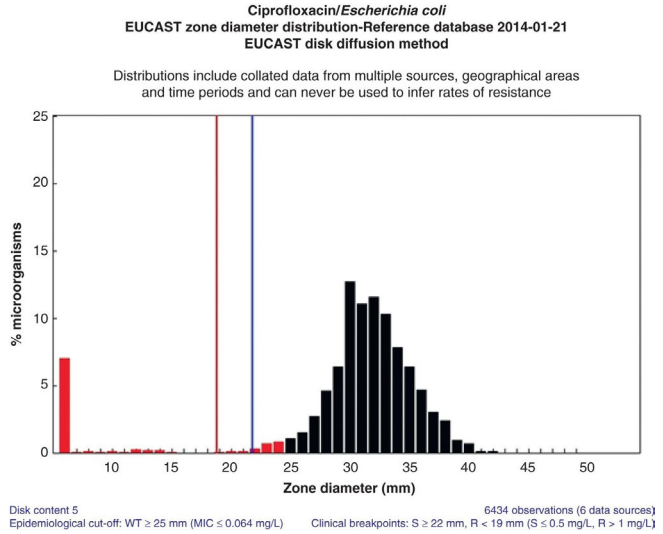


Figura 3. *Distribuzione del diametro della zona di inibizione di E. coli in seguito al passaggio da "MIC" a "Diffusione su disco".*

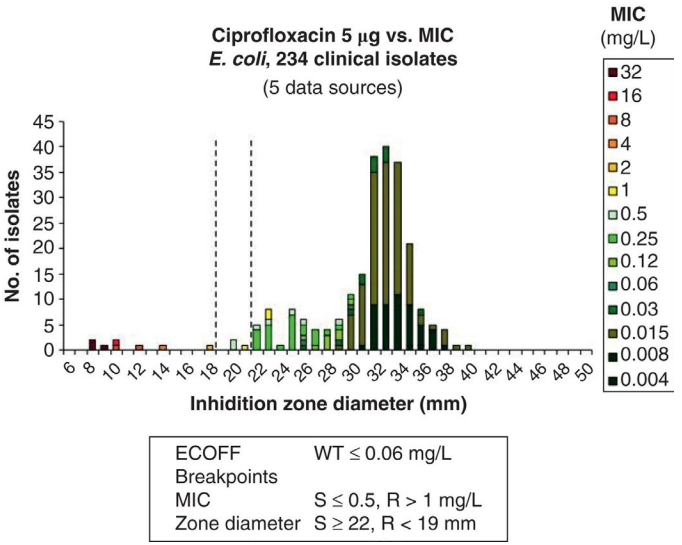


Figura 4. ***Relazione tra le MIC di E. coli ciprofloxacina e i diametri delle zone di inibizione utilizzati da EUCAST per determinare la correlazione tra le MIC e i diametri delle aree e per determinare i breakpoint dei diametri delle aree. I dati sono disponibili all'indirizzo:* http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/calibration_and_validation/.

5.6 COMPLETAMENTO DEL PROCESSO DI ARMONIZZAZIONE

Tra il 2002 e il 2010, i *breakpoint* europei per tutti gli agenti esistenti rilevanti sono stati armonizzati da EUCAST. Per ogni agente è stato prodotto e pubblicato sul sito web di EUCAST un documento di motivazione che descrive il processo di armonizzazione, elencando i dati utilizzati ed eventuali eccezioni rilevanti (http://www.eucast.org/documents/rd/).

I *breakpoint* armonizzati sono stati gradualmente introdotti nei sistemi nazionali e nel 2010 esisteva un set completo di *breakpoint* europei, accettato dalle autorità europee e dai colleghi di tutta Europa. Le aziende che producono materiali e macchine per i test di suscettibilità hanno gradualmente sviluppato i criteri

EUCAST per i test di suscettibilità automatizzati. Questo processo, lento e macchinoso e che frustrante per molti colleghi, ha rivelato i difetti intrinseci dei sistemi automatizzati, che mancano della flessibilità necessaria per i moderni test di suscettibilità. In un mondo con pochissimi nuovi antibiotici ma con un'orda di nuovi meccanismi di resistenza, e in cui la rapida modifica dei *breakpoint* per far fronte alle nuove sfide è della massima importanza, è inaccettabile dover aspettare a volte anni per avere dei nuovi *breakpoint*.

5.7 IL SITO WEB DI EUCAST

È stato creato un sito web (www.eucast.org) su direttive dell'ESCMID. Attualmente, conta circa 20.000 visite al mese da tutto il mondo. Il sito web elenca tutte le raccomandazioni e le pubblicazioni EUCAST, sia per i batteri che per i funghi, molte delle quali in diverse lingue, e tutti i documenti relativi. Offre l'accesso alle tabelle dei punti di rottura per lo schermo e la stampa. Fornisce inoltre materiale didattico e link alle distribuzioni delle MIC e dei diametri delle zone di inibizione. È gratuito e aperto a tutti.

5.8 SOTTOCOMITATI EUCAST

Negli ultimi 10 anni sono stati costituiti diversi sottocomitati con compiti e calendari definiti:

- Il sottocomitato sui test di suscettibilità antimicotica stabilisce i *breakpoint* per gli agenti antimicotici per *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. e fornisce una metodologia standard per entrambi gli organismi (http://www.eucast.org/antifungal_susceptibility_testing_afst/).

- Il sottocomitato sui test di suscettibilità degli anaerobi (attualmente non attivo) ha preparato le discussioni sui *breakpoint* per gli anaerobi Gram-positivi e Gram-negativi.
- Il sottocomitato sulle regole esperte e la lettura interpretativa nei test di suscettibilità (attualmente non attivo) ha pubblicato un articolo molto citato in cui vengono esaminate e classificate le prove a favore di varie regole esperte, spesso utilizzate dai microbiologi. Una regola tipica è la seguente: "Se uno *Staphylococcus aureus* si dimostra resistente alla meticillina, allora segnala l'organismo come resistente a tutti gli altri agenti beta-lattamici" (6). Le regole cambiano nel tempo e devono essere aggiornate regolarmente.
- Il sottocomitato sull'individuazione dei meccanismi di resistenza di interesse clinico e/o di salute pubblica (attualmente non attivo) è stato istituito per aiutare i colleghi a decidere quando i test di suscettibilità possono essere eseguiti solo con i *breakpoint* (ed essere riportati come test) e quando è importante rilevare, identificare e riportare un meccanismo di resistenza, indipendentemente dal fatto che l'organismo sia classificato o meno come resistente. Questo documento è disponibile sul sito web (http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/).

I sottocomitati attualmente non attivi sono stati sciolti perché hanno completato il compito loro assegnato. Il sottocomitato sui test di suscettibilità antimicotica, con un comitato direttivo di esperti nominati e un comitato generale con rappresentanti dei Paesi, continua il suo lavoro.

5.9 ACCORDO CON EMA

È stato raggiunto un accordo con l'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA; Londra, Regno Unito) e l'industria farmaceutica. È stata concordata una procedura operativa standard (SOP) che regola il ruolo di EUCAST nella definizione dei *breakpoint* per

gli agenti antimicrobici in fase di registrazione. La procedura è disponibile sui siti web dell'EMA e dell'EUCAST. L'industria farmaceutica è invitata a presentare o discutere i propri agenti con l'EUCAST prima, durante e dopo il processo di registrazione. Nell'ambito del processo normativo per la registrazione di nuovi farmaci, EUCAST, insieme all'EMA, ha fissato i *breakpoint* per la daptomicina, la tigeciclina e la ceftarolina, per citarne alcuni.

5.10 EUCAST, UE E ECDC

EUCAST ha ottenuto sovvenzioni dall'Unione Europea (UE) per sostenere il processo di armonizzazione dei *breakpoint* europei. Come tutte le altre "reti" finanziate dall'UE, EUCAST doveva essere incorporato nel Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) di Stoccolma, in Svezia, una volta costituito l'ECDC. Tuttavia, la struttura e il mandato di EUCAST non si adattavano al quadro delle altre reti finanziate dall'UE (come il già citato Sistema europeo di sorveglianza della resistenza (EARSS), diventato EARS-Net). A EUCAST è stato assegnato un "ruolo esterno" e ha risposto ai bandi di gara dell'ECDC per la determinazione dei *breakpoint* europei. L'EUCAST fornisce anche consulenza tecnica ed esperta all'ECDC in generale e all'EARS-Net in particolare. Si tratta di test di suscettibilità antimicrobica, valutazione esterna della qualità (EQA), necessità e metodi per l'individuazione, la categorizzazione e la segnalazione di meccanismi di resistenza di importanza clinica e/o di salute pubblica.

5.11 IL TEST DI DIFFUSIONE SU DISCO EUCAST

A seguito dei risultati di un questionario distribuito nel 2009 ai dipartimenti di microbiologia clinica di tutta Europa, EUCAST ha deciso di sviluppare un test di diffusione su disco basato su una piattaforma già nota alla maggior parte dei colleghi

europei, il terreno di Mueller Hinton con un inoculo confluente McFarland 0,5. Questo metodo è simile alle raccomandazioni del CLSI. Dato che il terreno raccomandato dal CLSI per l'*Haemophilus influenzae* veniva scelto poco, e dato che il sistema CLSI richiedeva due piastre diverse per trattare Basingstoke, gli streptococchi e l'*H. influenzae*, abbiamo scelto di sviluppare un terreno che potesse essere utilizzato sia per gli streptococchi che per l'*H. influenzae* e, come si è scoperto, per diversi altri organismi fastidiosi. Avevamo esperienza di un terreno utilizzato in Svezia e nel Regno Unito per l'*H. influenzae* e gli streptococchi, compreso lo *Staphylococcus pneumoniae*, il terreno Isosensitest (Oxoid Ltd, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, Regno Unito) integrato con il 5% di sangue di cavallo e beta-NAD. Isosensitest è stato sostituito con il terreno di Mueller Hinton (MH) e questo terreno (MH-F) è stato validato per l'uso con *H. influenzae*, streptococchi e molti altri microrganismi fastidiosi. I tre terreni CLSI sono stati ridotti a due terreni nel metodo EUCAST.

Si è ritenuto che i Paesi europei che già utilizzano la metodologia CLSI, in particolare la preparazione del terreno e dell'inoculo, avrebbero adottato più facilmente le raccomandazioni europee se il salto fosse stato meno drastico. L'obiettivo era quello di assicurarsi che tutti i Paesi europei utilizzassero gli stessi *breakpoint*. Senza un test di suscettibilità comune, questo obiettivo sarebbe difficile da raggiungere.

L'ESCMID ha deciso di assumersi la responsabilità finanziaria dello sviluppo del test di diffusione su disco. I lavori sono iniziati nel 2010. È stata creata una rete di laboratori di tutto il mondo, con il laboratorio di Växjö che ha svolto un ruolo di coordinamento. L'iniziativa ha ricevuto un grande sostegno da più parti. È stato deciso di basare tutte le raccomandazioni sui dati ottenuti con MH e con dischi di diversi produttori. Sono state prodotte delle piastre di microdiluizione in brodo (BMD), specifiche per le nostre esigenze e prodotte secondo le specifiche del documento ISO (7). Sono state offerte collezioni di isolati moderni con meccanismi di resistenza caratterizzati. Grazie alla produzione di dati paralleli di MIC e diametro di zona, il labora-

torio EUCAST ha creato migliaia di correlazioni MIC/diametro di zona, come quella mostrata nella Figura 4 e disponibile sul sito web di EUCAST (http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/calibration_and_validation/). Queste vengono utilizzate per calibrare correttamente i *breakpoint* del diametro della zona di diffusione su disco con i *breakpoint* delle MIC cliniche. La robustezza del metodo viene costantemente testata provocando i *breakpoint* del diametro di zona con l'aggiunta di molti isolati con resistenza "borderline". Il test di diffusione su disco EUCAST è stato recentemente descritto (8) e valutato in conformità alle raccomandazioni ISO (9,10).

Dal 2010 il metodo di diffusione su disco EUCAST è stato adottato da un paese dopo l'altro. Oggi tutti i Paesi nordici hanno adottato i metodi e i *breakpoint* EUCAST, così come l'Estonia, la Croazia, la Polonia, l'Italia, l'Austria, la Svizzera, la Slovenia, i Paesi Bassi, la Francia e molti altri Paesi europei, ma anche l'Australia e i Paesi dell'Africa. Le domande rivolte a EUCAST provengono da tutte le parti del mondo, compresi gli Stati Uniti, il Sud-Est asiatico, il Canada e il Sud America, il che indica chiaramente l'interesse internazionale per l'iniziativa EUCAST.

5.12 PARTECIPAZIONE DI PAESI EXTRAEUROPEI

La struttura e lo statuto di EUCAST sono stati modificati per consentire la partecipazione di soggetti extraeuropei. I Paesi sono stati incoraggiati a formare comitati nazionali per i test di suscettibilità antimicrobica (NAC) e ad aderire al Comitato generale di EUCAST. Più di 25 Paesi hanno già risposto all'appello, compresi Paesi molto lontani dall'Europa, come l'Australia, il Sudafrica e gli Stati Uniti. Molti dei NAC, compresi quelli di Australia e Stati Uniti, si sono presentati sul sito web di EUCAST (http://www.eucast.org/organization/nac/).

Nel CLSI, la struttura e il modello di business rimangono sostanzialmente invariati. I "Libri Blu" sono famosi sia per il loro contenuto strutturato sia per il denaro che costa acquisirli.

L'influenza dell'industria, sia quella farmaceutica che quella dei produttori di dispositivi e materiali per i test di suscettibilità antimicrobica, rimane la stessa.

5.13 EUCAST NEL 2014 E IN SEGUITO

Per alcuni anni EUCAST ha stipulato contratti a tempo variabile con ECDC, Stoccolma, Svezia. EUCAST risponde a bandi di gara. L'ECDC finanzia il lavoro di comitato di EUCAST e dei suoi sottocomitati. L'EUCAST fornisce consulenza all'ECDC, all'EMA e all'Agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA) su questioni relative ai test di suscettibilità, alla definizione dei *breakpoint* e degli ECOFF, al rilevamento della resistenza, alla misurazione dei tassi di resistenza e alla valutazione esterna della qualità dei test di suscettibilità antimicrobica. Per l'ECDC stiamo monitorando l'applicazione dei *breakpoint* e dei metodi EUCAST nei Paesi europei. Nel corso del 2013 diversi sondaggi hanno indicato che, negli ultimi 2-3 anni, la transizione dai sistemi precedenti ai *breakpoint* EUCAST è passata dal 30% al 70% dei laboratori. ESCMID ha accettato di assumersi la responsabilità finanziaria a lungo termine per il test di diffusione su disco EUCAST.

5.14 ARMONIZZAZIONE INTERNAZIONALE DI BREAKPOINT E METODI

A seguito di una decisione congiunta e con un protocollo d'intesa, EUCAST e CLSI hanno formato un sottocomitato ad hoc sulla "Determinazione dei metodi e dei *breakpoint* per la polimixina/colistina" con l'intento di arrivare a *breakpoint* internazionali armonizzati per le polimixine. Si tratta di un fattore importante, poiché per un numero crescente di pazienti questo farmaco rappresenta l'ultima risorsa nelle infezioni causate da isolati multiresistenti ai farmaci. La cooperazione tra i comitati mondiali per i *breakpoint* ha un grande valore simbolico.

Il metodo di diffusione su disco EUCAST è costruito sulla stessa piattaforma del metodo di diffusione su disco raccomandato dal CLSI, il che significa che per molte combinazioni agente/specie il diametro della zona di inibizione ottenuto nel test può essere interpretato rispetto alla tabella dei *breakpoint* EUCAST o CLSI.

Resta da vedere se si tratta di passi reali verso una futura armonizzazione internazionale. Nel 2014, il comitato francese ha raccomandato ai laboratori francesi di abbandonare il metodo di diffusione su disco CA-SFM e di adottare il metodo EUCAST. Solo il Regno Unito mantiene ancora il suo metodo di diffusione su disco basato su Isosensitest (calibrato sui *breakpoint* clinici EUCAST), ma i laboratori del Galles e della Scozia hanno adottato il metodo EUCAST e un numero crescente di laboratori del Regno Unito.

5.15 CONCLUSIONI

I test di suscettibilità antimicrobica in Europa sono ormai armonizzati, anche se ci vorrà del tempo prima che tutti i laboratori riescano a gestire la transizione. Se l'armonizzazione globale sia possibile o meno è un'altra questione. Potrebbe avvenire perché un numero crescente di Paesi e colleghi è attratto dalla facile e gratuita disponibilità delle raccomandazioni EUCAST e perché tutti possono partecipare al processo decisionale attraverso le consultazioni aperte pubblicate più volte all'anno sul sito web (www.eucast.org).

6 - DIVERSITÀ MOLECOLARE TRA β-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO E CARBAPENEMASI, E RESISTENZA ANTIMICROBICA

Tratto e tradotto da

Sawa T., Kooguchi K. & Moriyama K., *Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance*. J intensive care 8, 13 (2020).

https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6

Abstract

Insieme alla recente diffusione di batteri multiresistenti, le epidemie di batteri produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e carbapenemasi rappresentano una seria sfida per i medici. Gli antibiotici β-lattamici sono gli agenti antibatterici e le ESBL più frequentemente utilizzati e le carbapenemasi conferiscono resistenza non solo agli antibiotici carbapenemici ma anche alla penicillina e agli antibiotici cefalici. Il meccanismo della resistenza ai β-lattamici prevede una pompa di efflusso, una ridotta permeabilità, un'alterazione delle transpeptidasi e l'inattivazione da parte delle β-lattamasi. Il trasferimento genico orizzontale è il meccanismo più comune associato alla diffusione della resistenza ai β-lattami e ai carbapenemi a spettro esteso tra le specie batteriche patogene. Con l'aumento della resistenza antimicrobica, sono emersi molti tipi diversi di ESBL e carbapenemasi con caratteristiche enzimatiche differenti. Ad esempio, le carbapenemasi sono rappresentate nelle classi dalla A alla D del sistema di classificazione di Ambler. Poiché i batteri che ospitano diversi tipi di ESBL e carbapenemasi richiedono strategie terapeutiche specifiche, è essenziale per i medici comprendere le caratteristiche dei patogeni infettanti. In questa revisione, riassumiamo le attuali conoscenze sulla resistenza ai carbapenemi da parte delle ESBL e delle carbapenemasi, come le carbapenemasi di classe A, le AmpC a spettro esteso (ESAC) di classe C, le β-lattamasi di classe D che idrolizzano i carbapenemi (CHDL) e le metallo-β-lattamasi di classe B, con l'obiettivo di aiutare i medici di terapia intensiva nelle loro decisioni terapeutiche.

6.1 PREMESSE

Nell'ambito della recente diffusione di batteri multifarmacoresistenti, i focolai di batteri resistenti ai β-lattami e ai carbapenemi a spettro esteso rappresentano un problema serio che non solo rende difficile il trattamento, ma peggiora anche la prognosi dei pazienti infetti [1]. Gli antibiotici β-lattamici sono gli agenti antibatterici più frequentemente utilizzati e i β-lattamici a spettro esteso e i carbapenemi sono stati sviluppati come farmaci specifici per il trattamento di specie batteriche resistenti alle penicilline e ai cefenemi [2]. La resistenza batterica ai carbapenemi comprende non solo la resistenza agli antibiotici carbapenemici, ma anche quella alle penicilline e agli antibiotici cefemici. Pertanto, la resistenza ai carbapenemi rappresenta una minaccia significativa per i pazienti immunocompromessi e quindi suscettibili di infezioni causate da batteri multiresistenti in tutto il mondo [3]. Il meccanismo di resistenza ai β-lattamici a spettro esteso e ai carbapenemi prevede una pompa di efflusso, una ridotta permeabilità, un'alterazione delle transpeptidasi e l'inattivazione da parte delle β-lattamasi. Il trasferimento genico orizzontale è il meccanismo più comune associato alla diffusione della resistenza antimicrobica tra le specie batteriche patogene, come le *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (CPE) [4, 5]. Ogni anno vengono segnalate in varie specie batteriche delle nuove β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) o carbapenemasi con strutture o caratteristiche diverse.

Sono state segnalate diverse ESBL e carbapenemasi nelle *Enterobacteriaceae*, tra cui *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* [6, 7] e altre specie opportunistiche come *Serratia*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* [8]. Sono anche stati studiati, tra queste specie batteriche, gli elementi genetici attraverso i quali i geni resistenti ai farmaci si spostano orizzontalmente tra le specie batteriche. L'esempio tipico è *Pseudomonas aeruginosa*, uno dei principali agenti causali di infezione in individui immunocompromessi, che mostra resistenza a vari agenti antibatterici: il suo meccanismo di resistenza deriva, in parte, dalla resistenza naturale dell'organismo, ma è anche acquisito attraverso il trasferimento genico

orizzontale e/o mutazioni all'interno del suo DNA. *P. aeruginosa* è naturalmente resistente agli antibiotici β-lattamici, come la penicillina e il cefem, e agli antibiotici aminoglicosidi. A partire dagli anni '90 sono stati scoperti dei ceppi di *P. aeruginosa* che hanno acquisito resistenza alle penicilline ad ampio spettro, ai cefemi di terza generazione, ai carbapenemi, agli aminoglicosidi anti-P. *aeruginosa* e ai nuovi chinoloni [9, 10]. Tra questi *P. aeruginosa* multiresistenti (MDRP); una delle maggiori preoccupazioni cliniche è la diffusione dei ceppi di *P. aeruginosa* che ospitano una carbapenemasi, poiché gli antibiotici β-lattamici, compresi i carbapenemi, sono gli agenti antibatterici più usati. Sembrano essere efficaci contro gli MDRP: un farmaco antimeticillino-resistente per lo *Staphylococcus aureus* (MRSA), l'albekacina solfato, il monobattame aztreonam e il polipeptide colistina, ma è stata segnalata anche l'emergenza di ceppi resistenti, tra cui la *P. aeruginosa* ampiamente resistente ai farmaci (XDRP [*Extensively Drug-Resistant P. aeruginosa*]) e la *P. aeruginosa* pan-resistente (PDRP [*Pandrug-Resistant P. aeruginosa*]) [10, 11].

Ad oggi, sono emersi molti tipi diversi di ESBL e carbapenemasi con caratteristiche enzimatiche differenti [1]. Dato che la strategia terapeutica specifica dipende dal tipo di ESBL e carbapenemasi, è fondamentale per i medici comprendere le caratteristiche delle ESBL e delle carbapenemasi [12]; tuttavia, nella pratica, la complessa biologia associata alle ESBL e alle carbapenemasi pone sfide significative al controllo efficace delle infezioni. In questa revisione, riassumiamo la resistenza antimicrobica delle ESBL e delle carbapenemasi, con l'obiettivo di raccogliere le conoscenze attuali in questo campo per aiutare i medici di terapia intensiva a prendere delle decisioni terapeutiche.

6.2 ANTIBIOTICI β-LATTAMICI, PROTEINA LEGANTE LA PENICILLINA (PBP) E β-LATTAMASI

Inizieremo ribadendo il meccanismo d'azione degli antibiotici β-lattamici. Il principale costituente della parete cellulare for-

mata nello strato di membrana esterna degli eubatteri è il peptidoglicano, una struttura macromolecolare composta da peptidi e zuccheri (Fig. 1). Questa struttura peptidoglicanica conferisce resistenza alla pressione osmotica e mantiene la morfologia e la forza della cellula. È anche il bersaglio dei farmaci β-lattamici. Inibendo la formazione di questa struttura, i β-lattamici sopprimono la divisione cellulare batterica (azione batteriostatica) o inducono la rottura batterica contro la pressione osmotica (attività battericida). Il peptidoglicano possiede un'unità strutturale di base in cui si alternano due aminozuccheri di *N-acetilglucosamina* (NAG) e acido *N-acetilmuramico* (NAM) e una catena peptidica longitudinale legata al NAM forma un pilastro. Questa catena peptidica è un pentapeptide costituito da forme D e L alternate di residui di L-alanina, acido γ-D-glutammico, L-lisina, D-alanina e D-alanina. Al momento della reticolazione, la D-alanina al carbossi-terminale del pentapeptide viene prima eliminata per idrolisi. Successivamente, il quarto gruppo carbossilico della D-alanina e il terzo acido diaminopimelico, che è un derivato ε-carbossilico della lisina con la stessa struttura colonnare della molecola vicina, vengono combinati con una struttura peptidica di triglicina per il rafforzamento orizzontale della catena. Queste reazioni sono mediate dall'enzima batterico noto come PBP.

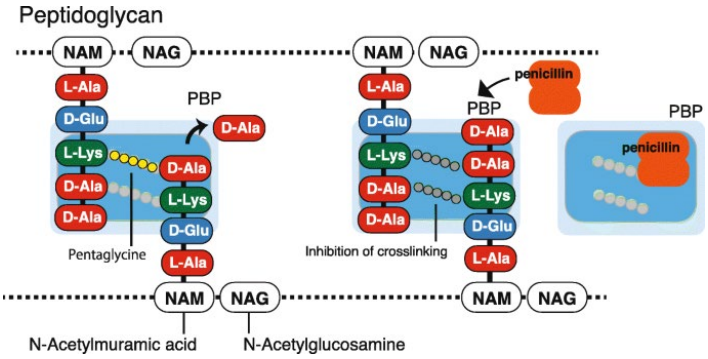


Figura 1.

L'azione antimicrobica delle β-lattamasi contro la struttura del peptidoglicano della membrana cellulare batterica. Il peptidoglicano possiede un'unità strutturale di base in cui si alternano due aminozuccheri di *N-acetilglucosamina* (NAG) e acido *N-acetilmuramico* (NAM) e una catena peptidica longitudinale legata al NAM forma un pilastro. Questa catena peptidica è un pentapeptide costituito da forme D e L alternate di L-alanina, acido γ-D-glutammico, L-lisina, D-alanina e D-alanina che forma un enzima batterico noto come proteina legante la penicillina (PBP). La PBP riconosce l'alanil-alanina, che è un dimero di alanina formato da D-alanina-D-alanina presente all'estremità del pentapeptide, ed esercita l'azione enzimatica di cross-linking. Poiché la penicillina è strutturalmente simile all'alanil-alanina nella regione terminale della struttura a pilastro, la PBP cattura la penicillina, inibendo così la reazione di reticolazione. Immagine a grandezza naturale

La PBP riconosce l'alanil-alanina, che è un dimero di alanina formato da D-alanina-D-alanina presente alla fine del pentapeptide, e la sua attività enzimatica media il cross-linking [13, 14]. La reazione di cross-linking è indotta dalla formazione di un legame covalente tra il residuo di serina nel centro attivo della PBP e il gruppo carbossilico prodotto dalla scissione idrolitica della D-alanina. In questo modo, la PBP mostra un'attività di adenil-alanina endopeptidasi. Poiché la penicillina ha una struttura simile a quella dell'alanil-alanina nella parte terminale di questa struttura a pilastro, la PBP non è in grado di distinguere tra queste strutture e si lega a entrambe, portando all'inibizione della reazione di reticolazione. Nel genoma di *E. coli* esistono sette tipi di geni PBP e nel genoma del ceppo di riferimento PAO1 di *P. aeruginosa* ne esistono otto (Fig. 2) [15]. Tra questi, cinque tipi di geni (PBP1A, PBP1B, PBP2, PBP3A e PBP3B) codificano PBP ad alto peso molecolare (HMM-PBP, peso molecolare da 60.000 a 90.000), i quali mostrano delle attività transglicosilasiche e transpeptidasiche e svolgono un ruolo nell'allungamento cellulare e nella formazione di partizioni. Nella divisione cellulare e nella morfogenesi, si ritiene che PBP1A e PBP1B siano coin-

volte nella crescita e nell'allungamento, PBP2 nella formazione di una forma gonococcica e PBP3 nella formazione di partizioni durante la divisione.

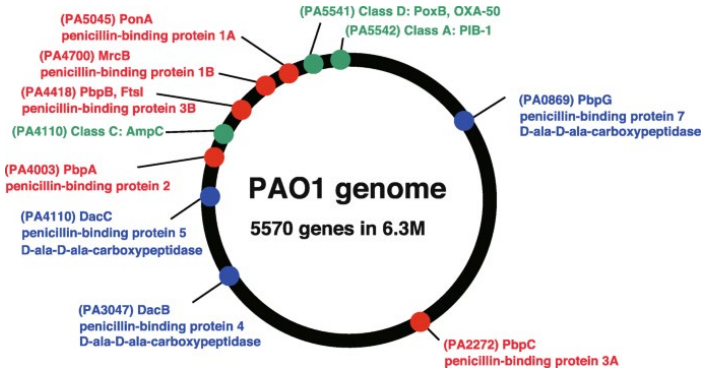


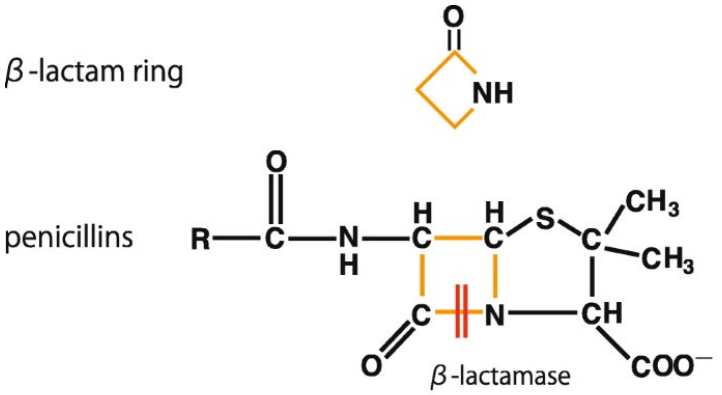
Figura 2.

I geni che codificano le proteine leganti la penicillina in *P. aeruginosa* PAO1. Nel genoma del ceppo di riferimento PAO1 di *P. aeruginosa* esistono otto tipi di geni PBP e tre geni cromosomici per le β-lattamasi PIB-1 (classe A), AmpC (classe C) e PoxB (classe D) [15]. Immagine a grandezza naturale

Gli altri tre tipi sono BPB a bassa massa molecolare (LMM-PBP; peso molecolare di 40.000-50.000) che mostrano attività di D-alanina carbossipeptidasi e sono ampiamente resistenti a vari β-lattamici. Il ruolo delle LMM-PBP è ancora oggetto di ricerca. Sia l'attività transpeptidasi dell'HMM-PBP che l'attività carbossipeptidasi dell'alanina dell'LMM-PBP utilizzano un residuo di serina come centro di attività enzimatica e l'agente antibatterico β-lattamico mostra un'attività inibitoria dell'enzima legandosi a questo residuo di serina; questa è una caratteristica comune delle β-lattamasi di classe A, C e D (di cui si parlerà più avanti). Come meccanismo di sviluppo di batteri resistenti, la specificità del substrato della PBP può essere modificata per ridurre la capacità di legarsi a un agente antibatterico a base di β-lattami. Ad esempio, l'MRSA produce PBP2', con una mutazione in PBP, che ha

una bassa affinità per i β-lattamici. Un altro esempio è il meccanismo di resistenza alla classe di agenti antibatterici glicopeptidici, come la vancomicina. In questo meccanismo, gli *Enterococchi* con il cluster genico *vanA* derivato dal trasposone Tn1546 esprimono un gruppo di enzimi che scambiano la catena longitudinale del peptidoglicano da D-alanina-D-alanina a D-alanina-D-serina e inibiscono il legame con la vancomicina.

In seguito, ribadiremo il meccanismo d'azione della β-lattamasi. La β-lattamasi inibisce l'attività antibatterica dissociando la struttura -CO-NH dell'anello β-lattamico, che fa parte della struttura di base dei β-lattami (Fig. 3). La struttura -CO-NH dell'anello β-lattamico comprende il peptide -CO-NH nel dimero alanil-alanina da cui si formano i legami incrociati del peptidoglicano. Pertanto, i β-lattami imitano l'alanil-alanina della struttura a pilastro del peptidoglicano e questa è la regione di legame. La β-lattamasi è quindi una proteasi (peptidasi) che dissocia i legami peptidici. La PBP è legata al substrato originale, l'alanil-alanina, e alla penicillina, che funziona come inibitore poiché condivide una struttura simile a quella dell'alanil-alanina. Questi risultati indicano che la PBP e la β-lattamasi condividono strutture simili perché esercitano l'attività peptidica, il che implica che la β-lattamasi potrebbe essere evolutivamente derivata dalla PBP.



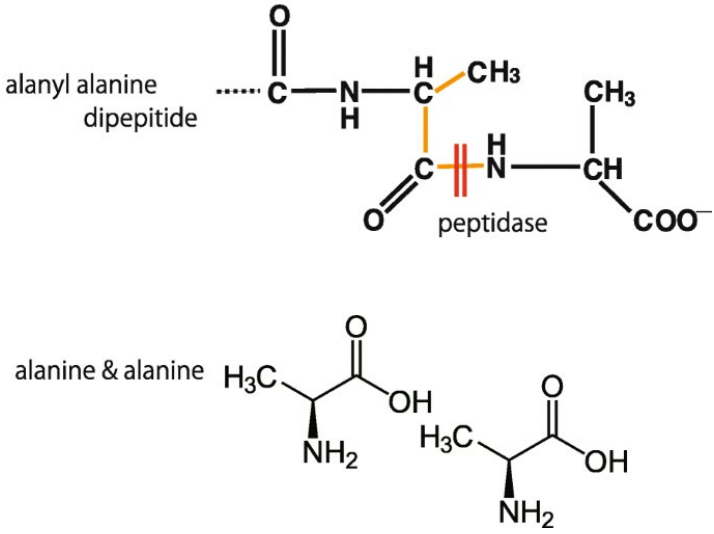


Figura 3.

L'azione enzimatica di una β-lattamasi sulle penicilline. L'anello β-lattamico è la struttura di base degli antibiotici β-lattamici. La β-lattamasi inibisce l'azione antibatterica dissociando la struttura -CO-NH dell'anello β-lattamico. La struttura -CO-NH dell'anello β-lattamico è simile al peptide -CO-NH dell'alanil-alanina, da cui si formano i legami incrociati del peptidoglicano. Pertanto, i β-lattami imitano l'alanil-alanina della struttura a pilastri del peptidoglicano. La β-lattamasi è quindi una proteasi (peptidasi) che dissocia la struttura -CO-NH dei β-lattami. Immagine a grandezza naturale

Infatti, i motivi del sito attivo dell'enzima S-X-X-K, S-D-N e K-S/T-G nella sequenza primaria delle β-lattamasi di classe A sono presenti anche nella PBP (Additional file 1: Figura S1). Ciò indica che le β-lattamasi e l'enzima di reticolazione del peptidoglicano, PBP, si sono co-evoluti. Attualmente, i β-lattami utilizzati clinicamente possono essere classificati in cinque strutture di base in grado di esercitare diverse attività antimicrobiche (Fig. 4). Molti di essi derivano da sostanze antibatteriche naturali prodotte da attinomiceti o funghi. Pertanto, gli stessi attinomiceti

sono resistenti ai propri agenti antimicrobici. Ciò indica che sia le sostanze antibatteriche sia gli agenti che le contrastano si sono co-evoluti negli attinomiceti.

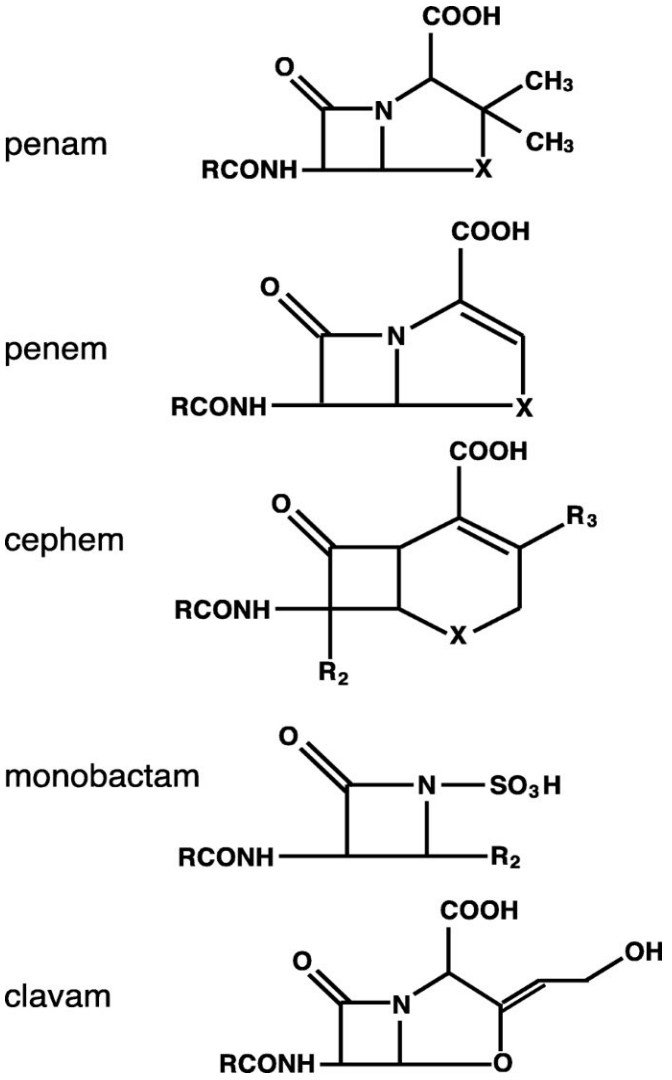


Figura 4.

La struttura chimica degli antimicrobici β-lattamici. I β-lattamici utilizzati clinicamente possono essere classificati in cinque strutture di base in grado di svolgere diverse attività antimicrobiche. Immagine a grandezza naturale

6.3 CLASSIFICAZIONE DELLE β-LATTAMASI E DELLA RESISTENZA AI FARMACI DI *P. AERUGINOSA*

Ad oggi, le β-lattamasi sono state classificate in base alla classificazione della struttura molecolare di Ambler [16] e alla classificazione funzionale di Bush-Jacobi-Medeiros (Fig. 5) [17, 18]. Nella classificazione di Ambler, le β-lattamasi sono raggruppate in quattro classi A, B, C e D in base ai motivi composti dalle sequenze primarie che costituiscono le molecole proteiche. Le β-lattamasi delle classi A, C e D utilizzano una serina come centro attivo dell'enzima, mentre le β-lattamasi della classe B utilizzano lo zinco metallico. Nella classificazione funzionale di Bush-Jacobi-Medeiros, le β-lattamasi sono classificate nei gruppi da 1 a 3 a seconda della degradazione dei substrati β-lattamici e degli effetti degli inibitori. Il gruppo 1 comprende le cefalosporinasi classificate come classe C in base alla classificazione strutturale molecolare e il gene coinvolto era originariamente cromosomico. Il gruppo 2 comprende le β-lattamasi diverse da quelle del gruppo 1 che hanno una serina nel centro attivo e include sia la classe A che la classe D secondo la classificazione strutturale molecolare. Il gruppo 3 comprende le metallo-β-lattamasi (MBL) e corrisponde alla classe B della classificazione strutturale molecolare. Nel genoma di *P. aeruginosa* PAO1, un ceppo standard di *P. aeruginosa* nonché primo ceppo sottoposto ad analisi di sequenza dell'intero genoma, sono codificate le β-lattamasi di classe A PIB-1 (PA5542), di classe C AmpC (PA 4410) e di classe D PoxB (OXA-50, PA5541) (Fig. 2). Quindi *P. aeruginosa* PAO1 è dotato di tre diversi tipi di β-lattamasi, mancando solo una β-lattamasi di classe B [15]. Questi geni di β-lattamasi intrinseci codificati dal

cromosoma di *P. aeruginosa* sono parzialmente responsabili della sua resistenza naturale alle penicilline e alle cefalosporine.

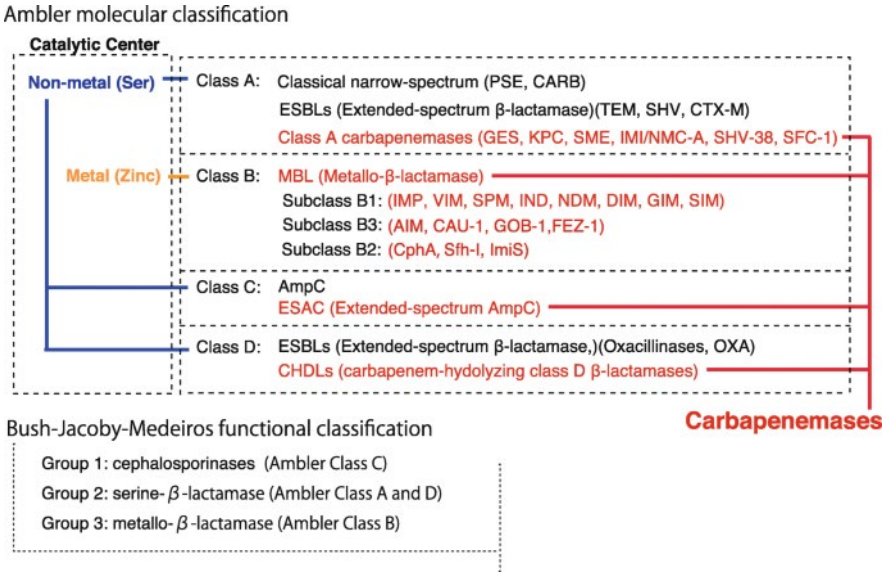


Figura 5.

La classificazione delle β-lattamasi. Sono state utilizzate sia la classificazione della struttura molecolare con il metodo Ambler [16] sia la classificazione funzionale con il metodo Bush-Jacobi-Medeiros [17, 18]. Nella classificazione di Ambler, le β-lattamasi sono raggruppate in quattro classi A, B, C e D in base a motivi composti da sequenze primarie che costituiscono le molecole proteiche. Le β-lattamasi delle classi A, C e D utilizzano una serina al centro attivo dell'enzima, mentre le β-lattamasi della classe B utilizzano ioni metallici di zinco. Nella classificazione funzionale secondo il metodo Bush-Jacobi-Medeiros, le β-lattamasi sono classificate nei gruppi da 1 a 3 a seconda della degradazione dei substrati β-lattamici e dell'effetto dell'inibitore. Immagine a grandezza naturale

6.4 ESBL E CARBAPENEMASI

Le ESBL degradano i sistemi cefalici di terza generazione (come il cefotaxime e il ceftazidime) [17] e sono caratterizzate dall'inibizione da parte degli inibitori delle β-lattamasi, come l'acido clavulanico, il sulbactam e il tazobactam [17]. La comparsa delle ESBL in organismi come *Klebsiella* ed *E. coli* indica che i geni produttori di β-lattamasi, come i geni di tipo TEM e SHV, codificati su un plasmide (plasmide R), hanno ampliato la gamma di farmaci bersaglio attraverso mutazioni genetiche [12, 19]. Poiché i geni di resistenza derivano dal plasmide, sono facilmente trasmessi tra diverse specie batteriche appartenenti allo stesso genere, come le *Enterobacteriaceae*. Le ripetute mutazioni delle ESBL hanno contribuito all'emergere di nuove β-lattamasi, le carbapenemasi, che idrolizzano gli antibiotici carbapenemici. In tutte le classi da A a D, basate sulla classificazione strutturale molecolare, sono state identificate delle β-lattamasi che degradano i carbapenemi. Le discuteremo di seguito.

6.4.1 PENICILLINASI DI CLASSE A, ESBL E CARBAPENEMASI

Le penicillinasi di classe A, come la PC1, che appartengono al sottogruppo funzionale 2a di Bush-Jacoby, idrolizzano uno spettro relativamente limitato di penicilline e si trovano prevalentemente nei ceppi Gram-positivi. Come ESBL di classe A che degradano le prime cefalosporine e appartengono al sottogruppo funzionale 2b di Bush-Jacoby, sono state segnalate negli anni '70-'80 delle TEM-1, TEM-2 e SHV-1 mediate da plasmidi [20]. Poco dopo sono state segnalate delle ESBL TEM e SHV mutate, come TEM-3, SHV-2 e CTX-M, che degradano efficacemente il cefotaxime ma rimangono sensibili all'inibizione da parte dell'acido clavulanico. Queste ESBL appartengono al sottogruppo funzionale 2be di Bush-Jacoby e, a partire dagli anni '90, sono state segnalate molte varianti come BEL-1, BES-1, SFO-1, PER e VEB come membri di questo gruppo [21]. TEM-30 e SHV-10, che idrolizzano le penicilline e mostrano una relativa resistenza all'acido clavulanico, al sulbactam e al tazobactam, appartengono al

sottogruppo funzionale 2br di Bush-Jacoby. La TEM-50 è una lattamasi ad ampio spettro che idrolizza cefalosporine a spettro esteso (ossimino-β-lattamici) e monobattamici, ma mostra resistenza all'acido clavulanico, al sulbactam e al tazobactam. Gli enzimi di questo gruppo hanno acquisito resistenza all'acido clavulanico, al sulbactam e al tazobactam e appartengono al sottogruppo funzionale 2ber di Bush-Jacoby [22, 23]. Le carbenicillinasi e le cefalosporinasi di classe A, che appartengono al gruppo funzionale 2 di Bush-Jacoby, possono essere ulteriormente classificate in sottoclassi minori, come i gruppi funzionali 2c, 2ce e 2e [24]. Le β-lattamasi, come PSE-1 e CARB-3, appartenenti al sottogruppo funzionale 2c di Bush-Jacoby, idrolizzano la carbenicillina e sono inibite dall'acido clavulanico o dal tazobactam. Una sottoclasse di 2c, vale a dire la sottoclasse 2ce, comprende un enzima RTG-4 (CARB-10) che è stato recentemente identificato come una carbenicillinasi a spettro esteso e idrolizza carbenicillina, cefepime e cefpirome. La sottoclasse 2ce, che comprende CepA, idrolizza le cefalosporine a spettro esteso ed è inibita dall'acido clavulanico o dal tazobactam ma non dall'aztreonam.

Infine, alla fine degli anni '90, la β-lattamasi classificata come classe A è stata mutata per diventare una carbapenemasi, che degrada i carbapenemi [24]. Come caratteristica delle β-lattamasi di classe A sono stati mantenuti il motivo a tetrade S-X-X-K, la triade S-D-N e la triade K-S/T-G, che contengono la serina del sito attivo dell'enzima nelle loro sequenze primarie (File aggiuntivo 2: Figura S2) [25]. Inoltre, le carbapenemasi di classe A sono caratterizzate dalla suscettibilità all'inibizione da parte di inibitori delle β-lattamasi come l'acido clavulanico e il tazobactam e sono classificate come sottogruppo funzionale 2f di Bush-Jacoby [24]. Sono stati riportati sei tipi di carbapenemasi di classe A, tra cui GES (Guiana extended-spectrum β-lactamase) [26], SME (*Serratia marcescens enzyme*) [27], SHV (sulfidril lattamasi variabile) [28], KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi) [29, 30], IMI/NMC-A (imipenemasi/non-metallocarbapenemasi-A) [31], e SFC (*Serratia fonticola* carbapenemasi) (Fig. 6) [35, 36]. Il tipo KPC è trasmesso attraverso un plasmide ed è l'esempio più rap-

presentativo di carbapenemasi di classe A; inoltre, svolge un ruolo importante nel controllo delle caratteristiche dei batteri *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE) [37]. SFC-1 e SME sono state segnalate in *Serratia* e sono strettamente correlate alla KPC. SME e IMI/NMC-A sono codificati cromosomicamente, mentre il gene GES *blaGES* è inserito nell'integrone di classe 1 in un plasmide di *P. aeruginosa* [38].

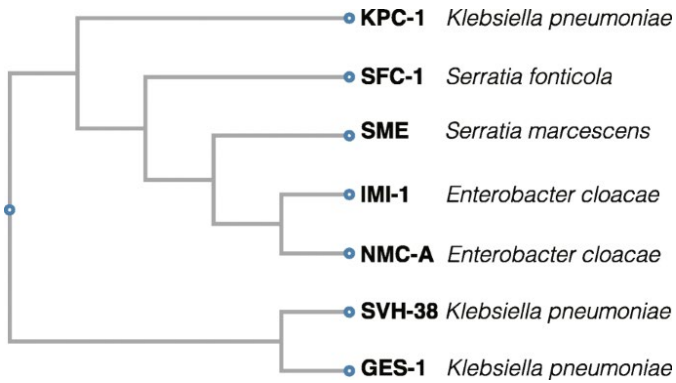


Figura 6

Albero filogenetico delle carbapenemasi di classe A. Albero filogenetico dei sei tipi di carbapenemasi di classe A: GES (*Guiana extended-spectrum β-lactamase*), SME (*Serratia marcescens* enzyme), SHV-38 (*sulfhydryl variable lactamase*), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI/NMC-A (imipenemase/non-metallocarbapenemase-A) e SFC-1 (*Serratia fonticola* carbapenemase). Sulla base delle sequenze primarie, l'albero è stato generato utilizzando Clustal Omega [32,33,34] di GenomeNet presso il Kyoto University Bioinformatics Center (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw). Immagine a grandezza naturale

6.4.2 CLASSE C ESAC

La β-lattamasi appartenente alla classe C deriva dal gene *ampC* presente nel genoma di molti membri del genere *Enterobacteria delle Enterobacteriaceae* ed è funzionalmente una cefalosporinasi

classificata nel gruppo funzionale 1 di Bush-Jacoby [39, 40]. È resistente all'acido clavulanico ma sensibile alle cefamicine, come la cefoxitina e la ceftazidima. Sebbene il livello di espressione di AmpC sia solitamente basso, può essere indotto dalla somministrazione di un sistema penicillinico o di acido clavulanico e può presentare resistenza ai carbapenemi quando è espresso in grandi quantità [1]. Alcune β-lattamasi appartenenti a questo gruppo, tra cui CMY, ACT, FOX e MIR, sono state codificate su un plasmide [41]. La preoccupazione più significativa è che le varianti di AmpC contribuiscano alla ridotta sensibilità ai carbapenemi. Queste β-lattamasi sono note come ESAC [42]. In *P. aeruginosa*, i mutanti AmpC sono stati collegati a una ridotta sensibilità a imipenem, ceftazidime e cefepime. Tali mutanti, compresi i mutanti CMY-10, CMY-19 e CMY-37 codificati dal plasmide, sono classificati nel sottogruppo funzionale 1e di Bush-Jacoby [43, 44].

Le β-lattamasi di classe C condividono circa il 40-50% di identità a livello di sequenza primaria. La regione amino-terminale è la più variabile, mentre la regione carbossil-terminale è relativamente conservata. Condividono tre motivi caratteristici delle β-lattamasi reattive alla serina: S-X-X-K nel sito attivo enzimatico, Y-X-N che punta verso il sito attivo e K-T-G che forma la parete opposta del sito attivo (Additional file 3: Figura S3) [45].

6.4.3 OSSACILLINASI ESBL DI CLASSE D (OXAS)

Le β-lattamasi di Ambler di classe D, note come enzimi OXA (Fig. 7), che comprendono OXA-1 e OXA-10, possiedono un sito attivo in serina simile alle β-lattamasi di classe A e C. Queste β-lattamasi mostrano attività di idrolisi della cloxacillina e dell'oxacillina e sono classificate nel gruppo funzionale 2d di Bush-Jacoby. Il livello complessivo di identità aminoacidica tra la classe D e le β-lattamasi di classe A o C è solo del 16% circa. Nelle β-lattamasi come OXA-11 e OXA-15, il substrato di degradazione è esteso alle cefalosporine a spettro esteso (ossimino-β-lattamici), ma non ai carbapenemi, e sono classificate come sottogruppo funzionale 2de di Bush-Jacoby [46, 47]. Questo tipo di β-lattamasi

è spesso codificato su plasmidi e/o integroni che ne consentono un'ampia diffusione [48]. Le β-lattamasi di classe D idrolizzanti i carbapenemi (CHDL) sono enzimi OXA che idrolizzano i carbapenemi e appartengono al sottogruppo funzionale 2df di Bush-Jacoby. Gli enzimi OXA con attività idrolizzante dei carbapenemi sono stati trovati principalmente sui cromosomi di ceppi di *Acinetobacter baumannii* [49], ma gli OXA-23 e OXA-48 sono stati riportati su plasmidi isolati da batteri enterici [50, 51]. Questi enzimi di tipo OXA sono diffusi in *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas* e *Burkholderi* [48, 52]. Al momento della stesura di questo articolo, nelle banche dati pubbliche sono state trovate 790 varianti di OXA. Analogamente alle β-lattamasi di classe A, le β-lattamasi di classe D conservano il motivo a tetrade S-X-X-K (compresa la serina del sito attivo dell'enzima), la triade Y-G-N/S e la triade K-T-G (Additional file 4: Figura S4) [53].

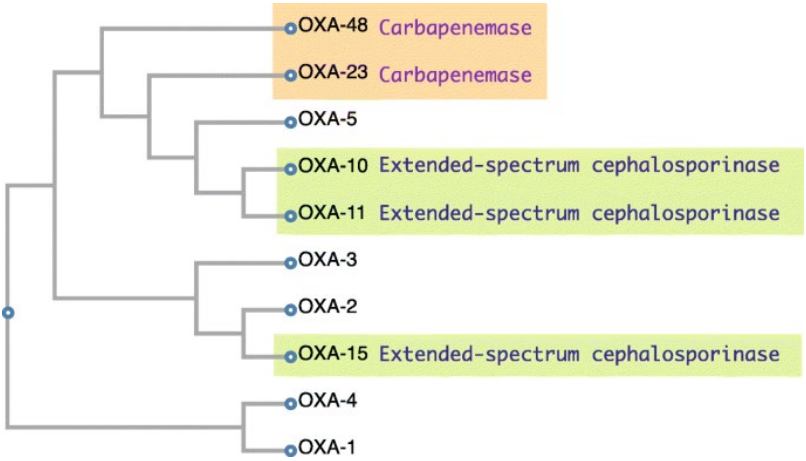


Figura 7.

Albero filogenetico della famiglia delle β-lattamasi OXA di classe D (oxacillinasi). Albero filogenetico delle β-lattamasi di tipo OXA. Le OXA-10, OXA-11 e OXA-15 sono riconosciute come cefalosporinasi a spettro esteso, mentre le OXA-23 e OXA-

48 sono riconosciute come β-lattamasi di classe D idrolizzanti i carbapenemi (CHDL). Sulla base delle sequenze primarie, l'albero è stato generato utilizzando Clustal Omega [32,33,34] di GenomeNet presso il Kyoto University Bioinformatics Center (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw). Immagine a grandezza naturale

6.4.4 CLASSE B MBL

La β-lattamasi di classe B è una MBL che possiede il metallo Zn2+ nel centro attivo dell'enzima, rispetto a un residuo di serina nella stessa posizione per altre classi di β-lattamasi [54]. Le β-lattamasi di classe B idrolizzano i carbapenemi e appartengono al gruppo funzionale 3 di Bush-Jacoby. *P. aeruginosa* portatore di MBL degrada tutti gli agenti β-lattamici tranne i monobattami. Poiché il metallo si trova nel centro attivo enzimatico, la sua attività enzimatica viene soppressa da un agente chelante, come l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). Il gene MBL può risiedere su un integrone, un trasposone, un plasmide, un cromosoma o varie altre molecole genetiche.

I componenti di un integrone segnalato per la prima volta nel 1989 comprendevano geni resistenti ai farmaci delle MBL di classe B e delle ESBL di classe A e D [55,56,57]. Le cassette geniche si integrano nel genoma attraverso l'interazione tra due siti di ricombinazione (*attI* e *attC*) e un'integrasi catalizza la ricombinazione genetica (Fig. 8). Il promotore, che si trova nel gene dell'integrasi a monte del sito di inserzione, controlla la trascrizione dei geni resistenti ai farmaci inseriti nella struttura a cassetta.

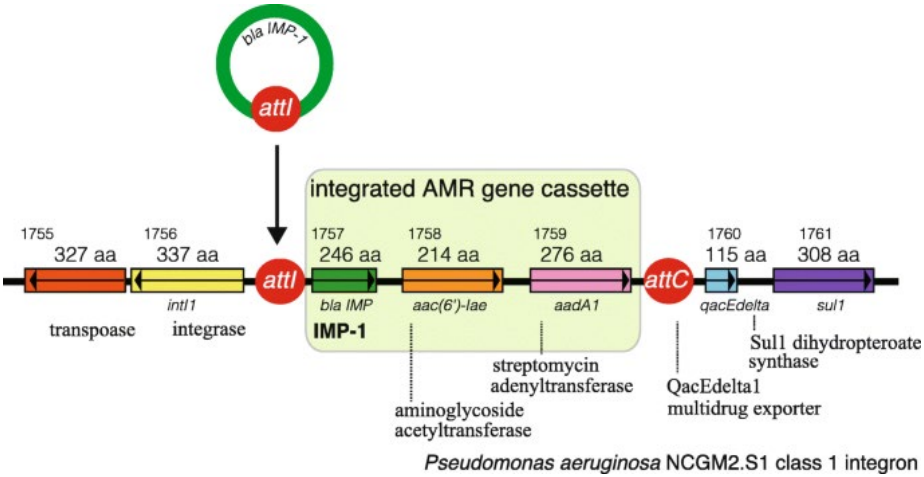


Figura 8.

Struttura genomica dell'integrone di classe 1 di *P. aeruginosa* NCGM2.S1. Il gene *intI*, che codifica l'integrasi Int1, catalizza la ricombinazione tra il sito *attI1* dell'integrone e il sito *att*C di una cassetta genica antimicrobica [56]. In *P. aeruginosa* NCGM2.S1 [58], multiresistente, tre cassette geniche antimicrobiche (*blaIMP-1*, *aac(6')-1ae* e *aadA1*) sono integrate nella regione tra *attI* e *att*C. Sono presenti il gene dell'integrasi *Int1*, il sito di integrazione *attI* e *qacE* parzialmente cancellato nel gene *sulI*, che codifica la resistenza alla sulfonamide. Immagine a grandezza naturale

Ad oggi, sono state segnalate le metallo-β-lattamasi resistenti ai carbapenemi, l'imipenemasi (IMP) [59], la MBL integrata di Verona (VIM) [60], la MBL di San Paolo (SPM) [61], l'imipenemasi di Germania (GIM) [62], la MBL di Nuova Delhi (NDM) [63] e l'imipenemasi di Firenze (FIM) [64] (Fig. 9 e Additional file 5: Figura S5). Tra queste, le MBL di tipo IMP e VIM, scoperte per la prima volta negli anni '90, sono le MBL principali [60, 65]. Vengono costantemente identificate nuove varianti di MBL di tipo IMP e VIM (File aggiuntivo 6: Figura S6 e File aggiuntivo 7: Figura S7). Al momento della stesura del presente documento, nei database pubblici sono state trovate 83 varianti IMP e 66 va-

rianti VIM. Le mutazioni presenti nelle varianti influenzano lo spettro delle attività dei carbapenemi, come l'attività contro imipenem, meropenem e doripenem [66]. Ad esempio, l'IMP-6, che presenta una sola sostituzione aminoacidica (da serina a glicina in posizione 214) rispetto all'IMP-1 (Additional file 6: Figura S6), ha aumentato la resistenza al meropenem e le *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* resistenti al meropenem portatrici di blaIMP-6 si sono diffuse in Giappone dal 2001 [67, 68]. Analogamente, VIM-4, che presenta solo un'inserzione aminoacidica (arginina in posizione 44) e una sostituzione aminoacidica (da serina ad arginina in posizione 265) rispetto a VIM-1 (Additional file 7: Figura S7), ha potenziato la resistenza ai carbapenemi e *P. aeruginosa* portatrice di *blaVIM-4*, segnalata per la prima volta nel 2002, è già stata individuata in tutto il mondo [69, 70]. IMP e VIM sono principalmente inclusi nella struttura dell'integrone e sono integrati nel DNA cromosomico e nel DNA plasmidico in associazione con il trasposone [60, 65]. L'NDM-1 è stato rilevato in isolati di *Klebsiella* ed *E. coli* provenienti da pazienti rientrati in Svezia nel 2008 dopo un viaggio in India, e il gene *blaNDM-1* era presente sul plasmide [63]. A differenza di IMP e VIM, NDM non è stato trovato nella struttura dell'integrone.

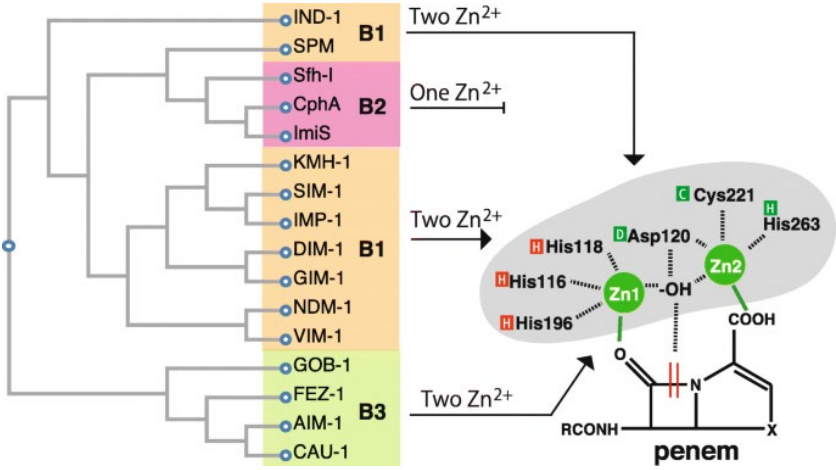


Figura 9.

Albero filogenetico della famiglia delle metallo-β-lattamasi di classe B. Le MBL possono essere classificate in tre sottoclassi (B1, B2, B3) sulla base delle loro sequenze aminoacidiche. Le sottoclassi B1 e B3 sono caratterizzate da due molecole di Zn2+ nel centro attivo dell'enzima (Zn1, Zn2), il che implica una gamma più ampia di substrati, mentre i substrati bersaglio della sottoclasse B2, che hanno un singolo Zn2+ nel centro attivo, sono più ristretti rispetto a quelli delle classi 1 e 3 [54]. Sulla base delle sequenze primarie, l'albero è stato generato utilizzando Clustal Omega [32,33,34] di GenomeNet presso il Kyoto University Bioinformatics Center (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw). Immagine a grandezza naturale

Le MBL possono essere classificate in tre sottoclassi (B1, B2, B3) in base alla loro sequenza aminoacidica (Fig. 9) [54, 71]. Il livello di identità aminoacidica tra i gruppi era pari o inferiore al 20%. La sottoclasse B1 comprende IMP, VIM, NDM e SPM, mentre la sottoclasse B3 include CAU-1, GOB-1 e FEZ-1, entrambi caratterizzati dalla presenza di due molecole di Zn2+ nel centro attivo dell'enzima (Zn1, Zn2), dalla degradazione di una gamma più ampia di substrati e dalla classificazione nel sottogruppo funzionale 3a di Bush-Jacoby [54]. Il sito di legame per Zn1 dell'enzima B1 coinvolge tre istidine (His116, His118 e His196) [72]. Il sito di legame per Zn2 dell'enzima B1 è costituito da aspartato, cisteina e istidina (sito DCH, Asp-120, Cys-221, His-263) (Additional file 5: Figura S5) [72], mentre i substrati target di degradazione per CphA, Sfh-I e ImiS, che sono MBL della sottoclasse B2 con un Zn2+ al centro attivo, sono stretti e queste MBL sono classificate nel sottogruppo funzionale 3b di Bush-Jacoby [73, 74].

6.5 SINTESI

Le ESBL e le carbapenemasi sono rappresentate in tutte le classi, da A a D, del sistema di classificazione di Ambler. Le carbapenemasi di classe A, rappresentate da GES e KPC, sono

codificate su plasmidi e sono più frequentemente rilevate in *P. aeruginosa* e *Klebsiella*. Come caratteristica, esercitano un effetto inibitorio nei confronti degli inibitori delle β-lattamasi, come l'acido clavulanico e il tazobactam. Le β-lattamasi appartenenti alla classe C, comprese le ESAC, sono codificate dal gene *amp*C presente sul cromosoma di molte *Enterobacteriaceae* e funzionano come cefalosporinasi. Nella classe D, gli enzimi OXA, originariamente oxacillinasi, sono mutati in CHDL. Questi enzimi sono stati trovati codificati anche sul cromosoma di *A. baumannii* resistente ai carbapenem e sui plasmidi dei batteri intestinali, come OXA-23 e OXA-48. Le β-lattamasi di classe B sono caratterizzate dalla presenza di un metallo Zn2+ nel loro centro di attività enzimatica. La *P. aeruginosa* portatrice di una MBL degrada tutti gli agenti β-lattamici, tranne i monobattami. Il gene MBL è codificato su un integrone, un trasposone, un plasmide, un cromosoma o varie altre molecole genetiche. Tra questi, gli enzimi di tipo IMP e VIM, scoperti per la prima volta negli anni '90, sono i principali MBL che si inseriscono nella struttura dell'integrone. Le MBL possono essere classificate in tre sottoclassi (B1, B2, B3) in base alla loro sequenza aminoacidica. La sottoclasse B1 comprende IMP, VIM e NDM. La sottoclasse B3 è caratterizzata dalla presenza di due molecole di zinco (Zn1, Zn2) nel centro attivo dell'enzima e dimostra una degradazione più estesa dei substrati, mentre la sottoclasse B2 ha un singolo Zn2+ nel centro attivo e mostra uno spettro ristretto di substrati. La Figura 10 riassume le carbapenemasi del sistema di classificazione di Ambler [16], comprese le informazioni funzionali basate sul metodo Bush-Jacobi-Medeiros [17, 18]. La Tabella 1 riassume lo schema di classificazione funzionale basato sulla proposta del 1995 di Bush-Jacobi-Medeiros [18], aggiornata da Bush-Jacobi [17] nel 2010. Insieme alla classificazione della struttura molecolare di Ambler, in questa tabella sono elencati anche i substrati antibiotici idrolizzati dalle β-lattamasi classificate e i profili degli inibitori delle β-lattamasi (acido clavulanico, sulbactam e tazobactam).

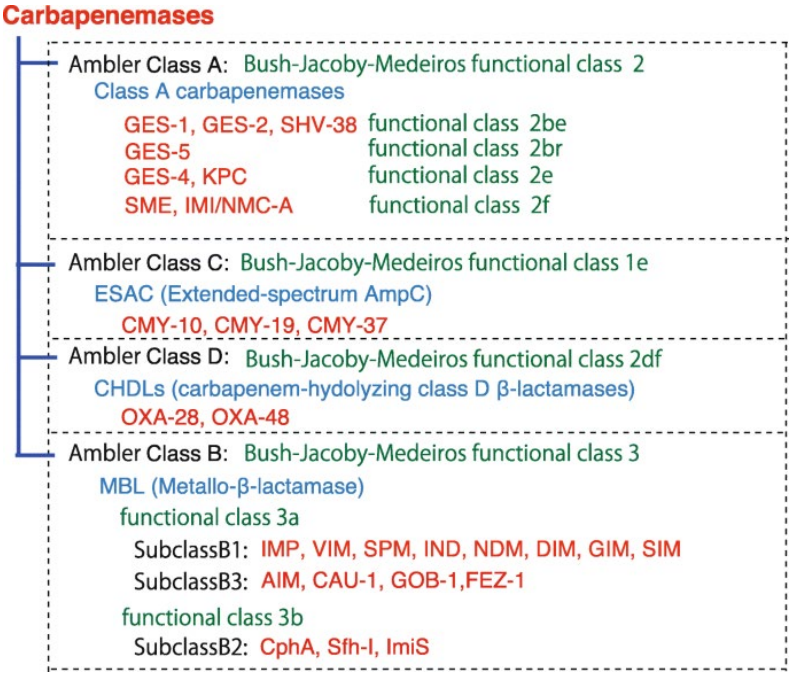


Figura 10.

La classificazione delle carbapenemasi. Le carbapenemasi sono rappresentate in tutte le classi, dalla A alla D, del sistema di classificazione di Ambler [16]. La classificazione funzionale, utilizzando il metodo Bush-Jacobi-Medeiros [17, 18], ha indicato che le carbapenemasi di classe A sono rappresentate da GES e KPC. Le β-lattamasi appartenenti alla classe C, che funzionano come cefalosporinasi, sono codificate dal gene *Amp*C presente sul cromosoma di molte Enterobacteriaceae. Gli enzimi ESAC sono noti come ESAC. Nella classe D, gli enzimi OXA, originariamente oxacillinasi, sono mutati per diventare CHDL. Le β-lattamasi di classe B sono caratterizzate dal possesso di un metallo Zn2+ come centro di attività enzimatica. Le β-lattamasi di tipo IMP e VIM sono le principali MBL che si inseriscono nella struttura dell'integrone. Le MBL possono essere classificate in

tre sottoclassi (B1, B2, B3) in base alla loro sequenza aminoacidica. Le sottoclassi B1 e B3 sono caratterizzate da due molecole di zinco (Zn1, Zn2) nel centro attivo dell'enzima e dimostrano una degradazione più estesa del substrato, mentre la sottoclasse B2 ha un singolo Zn2+ nel centro attivo e mostra uno spettro più ristretto. Immagine a grandezza naturale

Tabella 1. *Schemi di classificazione delle β-lattamasi batteriche secondo Bush-Jacoby [17,18]* Tabella a grandezza naturale

Di seguito è riportato un elenco di questioni importanti che i medici devono tenere a mente durante la gestione quotidiana delle infezioni:

1. Scienza di base: Le PBP (Fig. 2), che agiscono come endopeptidasi adenil-alanina, a livello enzimatico mirano a un'alanil-alanina della struttura a pilastri del peptidoglicano e catabolizzano i legami incrociati tra gli strati di peptidoglicano (Fig. 1). I β-lattami (Fig. 4) mimano la struttura dell'alanil-alanina (Fig. 3) e inibiscono l'azione enzimatica delle PBP. Le β-lattamasi condividono i motivi del sito attivo enzimatico con la famiglia delle PBP, indicando che le β-lattamasi e le PBP si sono co-evolute (Additional file 1: Figura S1).
2. Classificazione: le β-lattamasi sono state classificate in due modi: un metodo è basato sulla classificazione della struttura molecolare di Ambler, mentre l'altro metodo è basato sulla classificazione funzionale di Bush-Jacobi-Medeiros (Fig. 5). La comprensione delle classificazioni strutturali e funzionali è importante per i medici nella scelta dell'agente antimicrobico più appropriato (Tabella 1).
3. ESBL e carbapenemasi: Le ESBL e le carbapenemasi sono rappresentate in tutte le classi, da A a D, del sistema di classificazione di Ambler (Figg. 5 e 10). Le carbapenemasi di tutte le classi sono state trovate sia su plasmidi che su genomi cromosomici. Il gene *blaGES* della classe A (Fig. 6

e Additional file 2: Figura S2), *blaOXA* della classe D (Fig. 7 e Additional file 4: Figura S4) e i geni MBL della classe B (Fig. 9 e Additional file 5: Figura S5) sono spesso codificati in un integrone (Fig. 8). Le β-lattamasi a spettro esteso appartenenti alla classe C sono codificate dal gene *ampC*, solitamente trasportato sul cromosoma (Additional file 3: Figura S3).

4. Diversità: L'accumulo di piccole mutazioni nelle sequenze aminoacidiche primarie delle β-lattamasi finisce per estendere lo spettro dei substrati. I medici possono capire come l'uso di agenti antimicrobici possa influenzare la mutazione molecolare delle lattamasi analizzando l'allineamento delle sequenze aminoacidiche di specifiche MBL, come IMP (File aggiuntivo 6: Figura S6) e VIM (File aggiuntivo 7: Figura S7).
5. Diagnostica: Infine, la caratterizzazione della resistenza antimicrobica è fondamentale per la classificazione della resistenza ai β-lattamici. Per ulteriori informazioni, si rimanda ai riferimenti sulla rilevazione della resistenza mediata da β-lattamasi [75,76,77,78], poiché ciò esula dallo scopo di questa rassegna. In breve, i test microbiologici come l'Etest [76], il metodo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [77] e il Double Disc Synergy Test (DDST) [78] possono identificare i fenotipi di ESBL, MBL ed ESAC. I nuovi metodi di tipizzazione ORF (POT) basati sulla reazione a catena della polimerasi multiplex (PCR), utilizzati di routine nei laboratori clinici, sono in grado di identificare i geni prevalenti di ESBL e carbapenemasi, come SHV, GES, TEM, CTX-M e KPC di classe A, NDM, IMP e VIM di classe B e OXA-48 di classe D in *A. baumannii* [79], cloni di *P. aeruginosa* [80] e altri batteri patogeni. Le cassette geniche antimicrobiche, che talvolta sono integrate nella struttura dell'integrone attraverso l'interazione tra due siti di ricombinazione (*attI* e *attC*), possono essere identificate mediante amplificazione PCR con un set di primer specifico per le regioni della sequenza di consenso (CS) (5'-CS e 3'-CS)

situate a monte e a valle del sito di inserzione e successiva analisi della sequenza del DNA [81,82,83,84].

6.6 CONCLUSIONE

Diverse ESBL e carbapenemasi appartenenti a una delle quattro classi molecolari si sono diffuse e vengono rilevate tra i batteri di tutto il mondo, suggerendo che un'attenta rilevazione e monitoraggio sono fondamentali quando i medici di terapia intensiva trattano infezioni causate da batteri resistenti alle ESBL e ai carbapenem. Per la classificazione delle β-lattamasi, il metodo Ambler di classificazione della struttura molecolare [16] è semplice ed efficace nell'organizzare le varie ESBL e carbapenemasi, ma anche la classificazione funzionale con il metodo Bush-Jacobi-Medeiros [17, 18] è importante per i medici che devono trattare pazienti in condizioni critiche a causa di infezioni batteriche resistenti alle ESBL e ai carbapenem.

7 - I FATTORI DI VIRULENZA, BIOFILM E RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI DI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Tratto e tradotto da

Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L. e Wang H., *The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae*, Int J Environ Res Public Health. 2020 Sep; 17(17): 6278.

doi:10.3390/ijerph17176278

Abstract

Klebsiella pneumoniae è un importante patogeno opportunista gram-negativo che causa diverse malattie infettive, tra cui infezioni del tratto urinario, batteriemia, polmonite e ascessi epatici. Con l'emergere di ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti (MDR) e ipervirulenti (*hvKP*), la rapida diffusione di questi ceppi clinici in diversi territori è particolarmente preoccupante. Tuttavia, i meccanismi della virulenza e della resistenza agli antibiotici di *K. pneumoniae* non sono ancora molto chiari. Pertanto, lo studio e la comprensione dei meccanismi patogenetici e di resistenza ai farmaci dell'infezione da *K. pneumoniae* sono parti importanti della ricerca medica attuale. In questo lavoro abbiamo riassunto sistematicamente i meccanismi di virulenza, biofilm e resistenza agli antibiotici di *K. pneumoniae* e vi abbiamo applicato il sequenziamento dell'intero genoma e della proteomica globale, che forniranno nuovi indizi per il trattamento clinico di *K. pneumoniae*.

7.1 INTRODUZIONE

La Klebsiella pneumoniae è una classe di batteri gram-negativi che si trova in modo ubiquitario sulla superficie delle mucose degli animali o nell'ambiente (come acqua, suolo, ecc.). Nell'uo-

mo, *K. pneumoniae* si concentra nel tratto gastrointestinale e in pochi casi nel rinofaringe, attraverso i quali i batteri possono entrare nella circolazione sanguigna o in altri tessuti e quindi causare infezioni. Nell'era pre-antibiotica, *K. pneumoniae* era un patogeno fondamentale della polmonite contratta in comunità (CAP), soprattutto nei diabetici e negli alcolisti. Nell'era degli antibiotici che è seguita, è diventato una delle principali cause di infezioni mediche negli ospedali [1] e un fattore di rischio di gravi infezioni acquisite in comunità [2]. A Singapore, i tassi di mortalità per batteriemia da *K. pneumoniae* variavano dal 20 al 26% [3]. In Cina, *K. pneumoniae* costituiva l'11,9% dei patogeni isolati nella polmonite associata a ventilatore (VAP [*Ventilator-Associated Pneumonia*]) e nella polmonite acquisita in unità di terapia intensiva (ICU [*Intensive Care Unit*]) [4]. Inoltre, le Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE [Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae]) causate da *K. pneumoniae* hanno rappresentato il 73,9% di 664 campioni clinici in uno studio clinico multicentrico che ha riguardato 25 ospedali "AAA" in 14 province della Cina [5]. Non c'è dubbio che una prevalenza e un tasso di mortalità così elevati di infezioni da *K. pneumoniae* abbiano causato un grande onere per il sistema sanitario del Paese.

K. pneumoniae possiede molti genomi accessori di plasmidi e loci genici cromosomici. In base al genoma accessorio, i ceppi di *K. pneumoniae* sono suddivisi in tre tipi: opportunistici, ipervirulenti e multiresistenti ai farmaci (MDR) [6]. Recentemente, la maggior parte delle infezioni da *K. pneumoniae* è stata causata dai ceppi *classici di K. pneumoniae* (*cKp*) che sono rimasti in vita negli ospedali e hanno poi causato l'infezione in pazienti deboli. Il ceppo *cKp* sembra essere diverso dall'*hvKp*. I fattori genetici del fenotipo ad alta virulenza di *hvKp* sono presenti su un plasmide virulento di grandi dimensioni; possono inoltre essere presenti elementi coniugativi e integrativi. L'infezione *da hvKp* spesso si verifica in più siti e successivamente si diffonde, il che rende più difficile il trattamento e il controllo. La variante del ceppo *hvKp*, scoperta per la prima volta nel Circolo del Pacifico, può portare a infezioni acquisite in comunità, aggressive e metastatiche nel

diabete o nella normale funzione immunitaria con ascessi epatici, endoftalmite, meningite e artrite settica nei giovani [7,8,9]. Nel frattempo, l'emergere e la diffusione di ceppi MDR è un problema urgente da risolvere nel campo di *K. pneumoniae*. La caratteristica di *K. pneumoniae* MDR è strettamente legata ai geni di resistenza agli antibiotici (ARG) codificati dal plasmide. Grazie ai plasmidi e agli elementi genetici trasferibili, *K. pneumoniae* continua ad accumulare ARG nel contesto di un uso improprio di antibiotici, portando all'emergere di un ceppo estremamente resistente ai farmaci (XDR) con un "super-resistoma" [10]. Quindi è urgente esplorare ulteriormente i meccanismi di virulenza e resistenza ai farmaci in *K. pneumoniae*.

7.2 VIRULENZA

Per metter in atto l'infezione, *K. pneumoniae* deve innanzitutto superare le barriere meccaniche e chimiche ed eludere il riconoscimento da parte dell'immunità umorale e cellulare dell'ospite. Una volta entrati nell'ospite, i microrganismi invasivi vengono riconosciuti dalle cellule immunitarie attraverso i recettori di riconoscimento (PRR) e stimolano l'organismo a produrre vari mediatori immunitari [11]. Il sistema fagocitario mononucleare svolge un ruolo critico nella risposta immunitaria innata, con la funzione di fagocitosi e di coordinamento della risposta immunitaria attraverso l'effetto di citochine e chemochine. I neutrofili sono le cellule effettrici che si presentano per prime nei siti di infezione. IL-8 e IL-23 sono importanti mediatori coinvolti in questo processo, che inducono la produzione di IL-17 per promuovere la granulocitopoiesi [12,13]. L'IL-12 può anche aumentare il livello di IL-17 attraverso l'aumento dell'interferone gamma. Oltre a ciò, altri fattori coinvolti nella risposta immunitaria sono la produzione di IL-1β e altri fattori pro-infiammatori, tra cui l'IL-6 e il fattore di necrosi tumorale-α (TNF-α) [14].

Attualmente sono stati identificati quattro fattori virulenti: pili, capsula, lipopolisaccaride (LPS) e trasportatori di ferro [15]. *K. pneumoniae* è assemblato da adesine, pili di tipo 1 e 3, e promuove l'adesione batterica a cellule epiteliali, immunitarie e superfici abiotiche (Figura 1).

RmpA è un fattore di virulenza plasmidico di *K. pneumoniae* che regola la sintesi dei polisaccaridi capsulari. I ceppi *portatori di RmpA* sono stati significativamente associati al fenotipo ad alto contenuto di muco di *hvKP* e all'infezione purulenta dei tessuti, come l'ascesso epatico [16]. Sebbene la capsula svolga un ruolo fondamentale nel proteggere *K. pneumoniae* dalle risposte immunitarie dell'ospite, la sua virulenza può essere causata da altri fattori. Infatti, l'LPS dei principali ceppi di *K. pneumoniae* può essere in parte modificato e questo fa sì che *K. pneumoniae* non venga riconosciuto dalla cellula ospite, mentre altri ceppi possono utilizzare la capsula per mimetizzare l'LPS ed evitare il riconoscimento del recettore toll-like 4 (TLR4) [17,18].

La risposta infiammatoria è inibita e la clearance dei batteri è ridotta da queste modifiche. Allo stesso tempo, la capacità di assorbire ferro è fondamentale per la crescita e la replicazione dei batteri. In *K. pneumoniae* esistono quattro molecole che assorbono il ferro (trasportatori di ferro): enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina, rispettivamente. L'enteromicina è presente sia nei ceppi tipici che in quelli altamente virulenti, ha la più alta affinità per il ferro ed è considerata il principale sistema di assorbimento del ferro.

A differenza dell'enteromicina, la gastrina e la yersinide sono più diffuse nella *hvKp* che nella *cKp* [12,13]. La salmochelina è associata a malattie invasive ed è comune nei ceppi di *K. pneumoniae* altamente virulenti che causano gravi infezioni comunitarie, come ascesso epatico e polmonite [19]. Uno studio recente ha indicato che i ceppi *hvKp* sono in grado di produrre molecole che assorbono il ferro più grandi e più attivate, rispetto ai ceppi non virulenti, il che può portare alla loro virulenza e patogenicità [20].

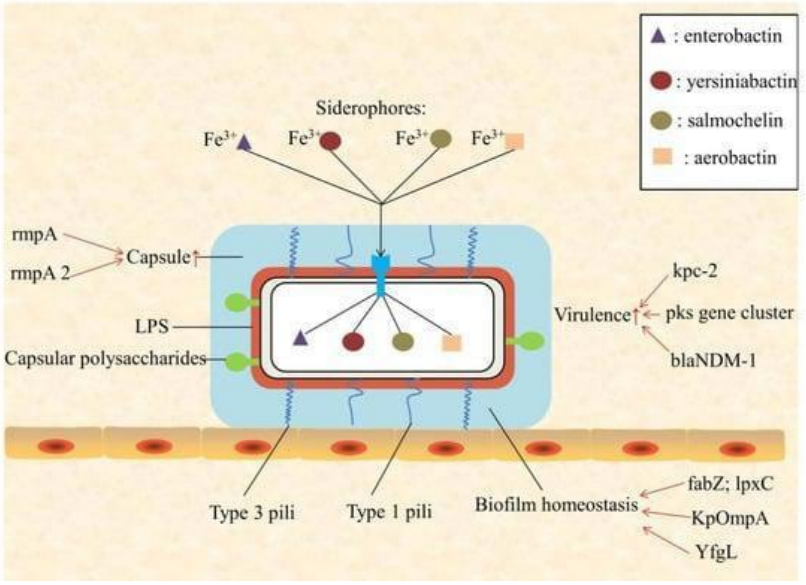


Figura 1. *Presentazione schematica dei fattori di virulenza di Klebsiella pneumoniae e dell'omeostasi del biofilm.*

Inoltre, negli ultimi anni sono stati presi in considerazione alcuni particolari fattori di virulenza dei ceppi di *K. pneumoniae*. I cluster del gene *Pks* possono essere rilevati nelle infezioni del flusso sanguigno (BSI) causate da ceppi *pks* positivi (*pks+*). La colibactina è una sostanza tossica codificata dai cluster genici *pks*, che contribuisce a danneggiare il DNA dell'ospite e a potenziare la virulenza dei ceppi [21]. Monitorando la prevalenza della meningite batterica *da K. pneumoniae*, Xu et al. hanno riscontrato che devono essere tenute in considerazione l'alta prevalenza e la mortalità della meningite da gene *kpc-2* che produce *hvKP* [22]. Alcuni tipi di sequenza "ad alto rischio" di *K. pneumoniae*, come i cloni STs11, 15 e 383, hanno mostrato una combinazione di resistenza ai farmaci e fattore di virulenza. In questi ceppi, molti elementi sono trasportati su un grande plasmide virulento (come ST147 con *blaNDM-1*), che di solito codifica geni vettori del ferro (come aerobactina, salmochelina ed enterochelina),

geni di resistenza ai metalli pesanti (che codificano la resistenza alla tellurite, all'argento, al rame e al piombo) e geni di sovraregolazione delle capsule, *rmpA* e *rmpA2*. L'emergere di questa combinazione di resistenza e virulenza è preoccupante [23]. È necessario condurre uno studio approfondito e un monitoraggio epidemico di alcuni ceppi altamente virulenti. Sebbene le caratteristiche cliniche dell'infezione da ceppi *hvKp* siano state completamente chiarite, esistono solo pochi indicatori biologici affidabili per distinguere questi ceppi da altri ceppi di *K. pneumoniae*. L'aerobactina svolge un ruolo importante nel trasporto del ferro, nella crescita e nella virulenza di *K. pneumoniae*, pertanto è considerata il fattore di virulenza chiave di *hvKP*. L'elevato livello di espressione dell'aerobactina nel ceppo è una caratteristica significativa del ceppo *hvKP*. Li et al. hanno rivelato che lo string test combinato con l'indice di aerobactina e *rmpA* è utile per migliorare il tasso di rilevamento di *hvKP* [16]. Abbiamo riassunto sistematicamente i geni relativi alla virulenza, al biofilm e alla resistenza agli antibiotici, e le loro funzioni di *K. pneumoniae* sono riassunte sistematicamente nella Tabella 1.

Le caratteristiche di *K. Pneumoniae*	Nome del gene	Funzione	Riferimenti
Virulenza	*rmpA*	Sintesi dei polisaccaridi capsulari; fenotipo ad alto contenuto di muco di *hvKP*	[16]
	rmpA2	Regolazione della capsula	[23]
	enterobactina	Trasportatori di ferro; crescita e replicazione dei batteri	[12,13]
	yersiniabactina	Trasportatori di ferro; crescita e replicazione dei batteri	[12,13]
	salmochelin	Portatori di ferro; crescita e replicazione dei batteri; *K. pneumoniae* altamente virulento	[12,13,19]
	aerobactina	Portatori di ferro; crescita e replicazione dei batteri; tasso di rilevamento di *hvKP*; *K. pneumoniae* altamente virulento	[12,13,16]
	cluster genico pks	Danno al DNA dell'ospite; potenziamento della virulenza dei ceppi	[21]
	kpc-2	Alta prevalenza e mortalità dell'*hvKP*	[22]
	blaNDM-1	Plasmide virulento di grandi dimensioni	[23]

Biofilm	*fabZ; lpxC*	Omeostasi del biofilm	[24]
	YfgL (BamB)	formazione del biofilm; espressione trascrizionale dei pili di tipo 1	[25]
	KpOmpA	Riconoscimento cellula-cellula, adesione e risposta immunitaria; patogenicità	[26]
Resistenza agli aminoglicosidi	*16S rRNA metilasi*	Codifica un enzima che blocca il legame degli antibiotici aminoglicosidi con il 16S rRNA.	[27]
	famiglie aac	Geni di resistenza mediati da plasmidi	[27]
	famiglie ant	Geni di resistenza mediati da plasmidi	[27]
	famiglie aph	Geni di resistenza mediati da plasmidi	[27]
	AcrAB-TolC	Sistemi di pompe di efflusso; resistenza a tobramicina e gentamicina	[28]
	kpnEF	Sistemi di pompe di efflusso; resistenza significativa alla tobramicina e alla spectinomicina.	[29]
	KpnO	Direttamente coinvolto nella resistenza agli aminoglicosidi; resistenza alla tobramicina, alla streptomicina e alla spectinomicina.	[30]
	rrs o rpsL	Mutazioni di *rpsL* associate ad alti costi di fitness e ridotta virulenza	[31]
Resistenza ai chinoloni	*DNA girasi (subunità gyrA-gyrB) Topoisomerasi IV (subunità parC-parE)*	Resistenza all'acido nalidixico e all'ofloxacina	[32]
	OmpK36	Permeabilità cellulare	[33]
	acrAB	Permeabilità cellulare	[34]
	kdeA	Permeabilità cellulare	[35]
	OqxAB	Pompa di efflusso; resistenza ai chinoloni mediata da plasmide	[36]
	qnr	Codifica una famiglia di proteine che proteggono la DNA girasi e la topoisomerasi IV dall'attività inibitoria dei chinoloni	[37]
	aa(6')-Ib-cr	Modifica dei chinoloni	[37]

Resistenza ai β-lattami	*blaSHV-1* e blaTEM-1	Resistenza alla penicillina	[38]
	blaSHV-2	Gene della β-lattamasi a spettro esteso (ESBL)	[38]
	blaTEM-3	variante ESBL mediata da plasmide	[38]
	blaCTX-M	ESBL in *K. pneumoniae* causate da focolai iatrogeni	[39]
	ramA	Attivazione della pompa di efflusso; aumento della resistenza acquisita ai β-lattamasi mediata da β-lattamici	[40]
	blaOXA, *blaGES*, *blaSFO*, *blaPER*, *blaTLA*, *blaVEB* e *bla* KLUC-5	Acquisizione del trasferimento genico orizzontale	[41,42,43,44]
Resistenza alla polimixina	*lpxM*, *ramA*	Maturazione del lipide A e neutralizzazione del lipide A	[45,46]
	pbgP, *pmrE*	Combinazione di amino arabinosio	[47,48]
	pmrC	Combinazione di fosfoetanolammina	[47,48]
	pagP	Combinazione di palmitato	[47,48]
	phoPQ, *pmrA*, *pmrD* e *mgrB*	Regolatori genici modificati da LPS	[49,50]
	RarA	Alta espressione delle pompe di efflusso *AcrAB-TolC* e *KpnEF*	[46]
	WcaJ	Fenotipo non mucoso; resistenza crescente alla polimixina	[51]
	mcr-1	Codifica una famiglia di transferasi della fosfoetanolammina in grado di legarsi alla fosfoetanolammina.	[52]
Resistenza alla tigeciclina	*AcrAB-TolC*, *OqxAB*	La sovraespressione delle pompe di efflusso porta alla resistenza alla tigeciclina	[53]
	RarA, *RamA*, *RamR* e *AcrR*	Regolatori delle pompe di efflusso	[53]
	Lon e *rpsJ*	Codifica la proteina S10 del ribosoma	[54]
	ompK35K	La diminuzione del livello di trascrizione della porina *ompK35K* può anche portare a una maggiore resistenza.	[55]
	tetA	Codifica di pompe di efflusso resistenti alle tetracicline	[56]

Tabella 1. *I geni legati alla virulenza, al biofilm e alla resistenza agli antibiotici di K. pneumoniae.*

7.3 BIOFILM

K. pneumoniae può formare biofilm e accumularsi nelle cellule toccate dalla matrice autogenerata di sostanza polimerica extracellulare (Figura 1). Le sostanze polimeriche extracellulari

sono strutture complesse contenenti polisaccaridi, proteine e DNA. La maggior parte dei biofilm di *K. pneumoniae* clinicamente evidenti si forma sul catetere e sulla superficie interna dei dispositivi interni [57]. Il biofilm *di K. pneumoniae* può portare alla colonizzazione delle vie respiratorie, gastrointestinali e urinarie, nonché allo sviluppo di infezioni invasive (soprattutto nei pazienti immunodepressi). Lo sviluppo del biofilm di *K. pneumoniae* sulla superficie di oggetti duri prevede l'adesione di cellule, la formazione di piccole colonie, la maturazione e la propagazione come cellule libere.

Le strutture di superficie più importanti di *K. pneumoniae* coinvolte nel processo di formazione sono i pili di tipo 3 e i polisaccaridi capsulari (CP) [58]. I pili mediano l'adesione stabile, mentre i CPs influenzano la struttura del biofilm e la comunicazione intercellulare. Data la dinamica della formazione del biofilm e la variabilità degli stimoli ambientali, il batterio incorporato deve avere la capacità di modificare rapidamente ed estensivamente l'espressione genica. La regolazione trascrizionale è regolata dal quorum sensing, un sistema che coordina i segnali e le risposte che controllano l'espressione genica in una popolazione microbica. Sono stati identificati i regolatori e gli autoinduttori putativi legati al quorum sensing in *K. pneumoniae*, ma i dati disponibili in materia sono ancora incompleti [58]. *K. pneumoniae* con biofilm è protetto dalla risposta immunitaria dell'ospite, in parte. Questa matrice inibisce la vicinanza di anticorpi e peptidi antimicrobici e riduce gli effetti del complemento e della fagocitosi [59]. Anche le mutazioni in alcuni geni specifici di *K. pneumoniae* possono influenzare la funzione del biofilm. Mostafavi et al. hanno scoperto che le mutazioni di *fabZ* e *lpxC* portano a una crescita di *K. pneumoniae* dipendente dall'inibitore *lpxC*, con conseguente perdita dell'omeostasi del biofilm [24]. Negli ultimi anni, la ricerca sulle proteine della membrana esterna di *K. pneumoniae* ha attirato l'attenzione dei ricercatori. Hsieh et al. hanno riportato che la lipoproteina YfgL (BamB) è coinvolta nella formazione del biofilm di *K. pneumoniae* e nell'espressione trascrizionale dei pili di tipo 1, che è fondamentale

per l'antifagocitosi di *K. pneumoniae* in vivo [25]. Inoltre, la proteina A della membrana esterna *di K. pneumoniae* (KpOmpA) è stata segnalata come coinvolta nell'adesione cellulare e nel riconoscimento cellula-cellula, nonché nella risposta immunitaria dell'ospite. Inoltre, il sito L3 sulla superficie di KpOmpA può essere correlato alla patogenicità di *K. pneumoniae* [26]. Lo stress ossidativo può ossidare e distruggere il biofilm di *K. pneumoniae*, con conseguente perdita delle principali proteine di membrana e dell'attività di *K. pneumoniae* [60]. Gli studi citati hanno rivelato che il biofilm *di K. pneumoniae* è una delle condizioni fondamentali per il mantenimento della sua attività.

7.4 RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

7.4.1 GENE DELLA RESISTENZA AGLI AMINOGLICOSIDI

Gli aminoglicosidi, in grado di inibire la sintesi proteica dei batteri, sono stati ampiamente utilizzati nella chemioterapia antibatterica dal 1940 al 1980, fino a quando sono stati sostituiti dai successivi carbapenemi, cefalosporine e fluorochinoloni [61]. In questo periodo, *K. pneumoniae* ha acquisito meccanismi di resistenza agli antibiotici, tra cui enzimi che modificano i farmaci con attività diverse (adenilazione, acetilazione o fosforilazione). Nel giro di dieci anni, in *K. pneumoniae sono stati* trovati tutti i tipi di geni di resistenza mediati da plasmidi delle famiglie di geni *aac*, *aph* e *ant*. L'uso ridotto di aminoglicosidi ha rallentato l'evoluzione dei nuovi geni resistenti fino a quando si è verificata la metilasi del 16SrRNA, appartenente alla famiglia dei geni *arm*A, che codifica un enzima che blocca il legame degli antibiotici aminoglicosidi al 16SrRNA [27]. Questi geni resistenti sono codificati da plasmidi in *K. pneumoniae*, mentre gli enzimi che modificano i farmaci hanno un'attività a spettro ristretto e la 16SrRNA-metilasi conferisce resistenza a quasi tutti gli aminoglicosidi, compresa la plazomicina e gli aminoglicosidi di recente sviluppo [62]. Tuttavia, una sorveglianza epidemica,

condotta da Cirit et al. in Turchia e Siria nel 2019, ha rilevato che la resistenza agli aminoglicosidi dello *K. pneumoniae* isolato clinicamente era mediata principalmente dall'*aac (3)-II*, invece che dalla 16SrRNA metilasi [63]. La localizzazione cromosomica della famiglia di geni *armA* in *K. pneumoniae* è stata riportata solo una volta [64]. In *K. pneumoniae* sono stati identificati anche altri plasmidi noti che mediano l'attività delle 16S rRNA metilasi, tra cui le famiglie di geni *NpmA* e *Rmt* [61], ma non è ancora stata trovata la localizzazione cromosomica.

Il meccanismo della tolleranza cromosomica di *K. pneumoniae* agli aminoglicosidi comprende la modifica della permeabilità cellulare (a causa di cambiamenti nei sistemi di pompe di efflusso *KpnEF* e *AcrAB-TolC*, ipotizzando la perdita delle porine *KpnO*) e dei geni degli enzimi modificatori di aminoglicosidi (AME). La delezione di *AcrAB-TolC ha* aumentato la sensibilità alla tobramicina e alla gentamicina [28], mentre il mutante *kpnEF* ha mostrato una significativa resistenza alla tobramicina e alla spectinomicina [29], ma ha tollerato solo leggermente la gentamicina e la streptomicina. Ciò indica che il dispositivo osmotico ha una diversa affinità per i diversi aminoglicosidi. Alcuni studi hanno riportato che le proteine del poro *KpnO* in vitro sono direttamente coinvolte nella resistenza agli aminoglicosidi e possono portare alla tolleranza di tobramicina, streptomicina e spectinomicina [30]. Nei ceppi clinici di *K. pneumoniae* non sono state identificate mutazioni che conferiscono resistenza mediante modifica del bersaglio, come *rpsL* o *rrs*. Le cause potrebbero essere gli elevati costi di fitness e la ridotta virulenza associati alle mutazioni *rpsL*, per cui sono relativamente rare [31]. Tra i ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alla gentamicina o all'amikacina, *acc (6')-Ib* è stato considerato il più diffuso, seguito da *acc (3')-II, aph (3')-IV* e *ant (3')-I* [65]. Inoltre, la resistenza agli aminoglicosidi è stata riscontrata anche in ceppi che producono β-lattamasi, con la presenza di più geni codificanti per la resistenza ai farmaci nei plasmidi, e ceppi di *K. pneumoniae* che coesistono con il gene *rmtC* e *blaNDM-1* sono stati isolati da campioni clinici turchi [66]. Pertanto, non dobbiamo prestare attenzione solo all'emer-

gere di geni di resistenza agli aminoglicosidi, ma anche a *K. pneumoniae* multiresistente.

7.4.2 GENE DELLA RESISTENZA AI CHINOLONI

Gli antibiotici chinolonici colpiscono le topoisomerasi batteriche per inibire la replicazione del DNA. Questi antibiotici sono stati applicati in clinica a partire dagli anni '60, ma sono stati maggiormente utilizzati dopo l'uso della prima classe di fluorochinoloni negli anni '80, il che ha portato all'evoluzione della resistenza batterica ai fluorochinoloni [67]. Il meccanismo della resistenza di *K. pneumoniae* ai fluorochinoloni comprende principalmente la mutazione del gene bersaglio, la produzione della pompa di efflusso MDR e la modifica degli enzimi e delle proteine di protezione del bersaglio [68].

K. pneumoniae trattato con l'acido nalidixico, farmaco chinolone di prima generazione, e con l'ofloxacina, farmaco fluorochinolonico di prima generazione, è stato anche accompagnato da una resistenza cromosomica all'acido nalidixico e all'ofloxacina. Il meccanismo primario di resistenza è la mutazione della DNA girasi (subunità *gyrA-gyrB*) che si lega al chinolone sul cromosoma e della topoisomerasi IV (subunità *parC-parE*). Le mutazioni in *par*C e *gyr*A in *K. pneumoniae* sono state riscontrate prima e più comunemente di quelle in *gyrB* e *parE* [32,69].

Alcuni studi hanno riportato che le alterazioni della permeabilità cellulare in *K. pneumoniae* sono anch'esse coinvolte nella resistenza ai chinoloni, tra cui principalmente la carenza di *OmpK36* [33], la sovraespressione del gene della pompa di efflusso multifarmaco *acrAB* [34] e la mancata alterazione di *kdeA* [35]. L'induzione di questi geni della pompa di efflusso multifarmaco in *E. coli* sensibili in vitro aumenterà la loro resistenza ai farmaci. Un'altra importante pompa di efflusso da *OqxAB* in *K. pneumoniae*, che originariamente si pensava derivasse dal cromosoma, si è poi dimostrata coinvolta nella resistenza ai chinoloni mediata da plasmidi (PMQR), nonché diffusa in altri batteri [36]. Si è an-

che scoperto che il regolatore della pompa di efflusso è coinvolto nella resistenza ai chinoloni di *K. pneumoniae* [70].

Un'altra classe di geni di resistenza ai chinoloni comprende il determinante PMQR, presente non solo in *K. pneumoniae*, ma anche in altre specie di Enterobacteriaceae. Il determinante PMQR è considerato uno dei fattori chiave che mediano la resistenza ai fluorochinoloni in *K. pneumoniae* [71,72]. Questi geni contengono il gene *qnr*, che codifica una famiglia di proteine che protegge la DNA girasi e la topoisomerasi IV dall'inibizione dei chinoloni. Il primo gene *qnr* è stato trovato sul plasmide di *K. pneumoniae* isolato negli USA nel 1994. I geni della pompa *QnrS1*, *qnrD*, *qnrB* e *oqxAB* sono stati rilevati in ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti ai farmaci [73]. Sebbene queste proteine siano codificate cromosomicamente in altri batteri gram-negativi (tra cui *Shewanella algae*, *Citrobacter* spp, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Serratia marcescens*) [37], non vi è ancora alcuna prova che il gene *qnr* si trovi sul cromosoma di *K. pneumoniae*. Ciò suggerisce che il gene *qnr* possa essere uno dei geni che codificano i plasmidi di *K. pneumoniae* resistenti ai chinoloni.

Un altro gene PMQR, *aa(6')-Ib-cr*, è considerato l'unico gene di *K. pneumoniae* responsabile della modificazione dei chinoloni [37]. È in grado di inattivare i chinoloni a spettro ristretto, come la ciprofloxacina e la norfloxacina, che contengono il substrato di questo enzima, il gruppo piperazinico non sostituito. Originariamente è stato trovato codificato dal plasmide di *K. pneumoniae*, ma recentemente è stato trovato anche sui cromosomi. La resistenza agli aminoglicosidi è solitamente accompagnata da resistenza ai β-lattami e ai chinoloni; l'*aa(6')-Ib-cr* conferisce resistenza agli aminoglicosidi (kanamicina, tobramicina e amikacina) e ai chinoloni (norfloxacina e ciprofloxacina) [74].

7.4.3 GENE DELLA RESISTENZA AI β-LATTAMI

Gli antibiotici β-lattamici sono stati utilizzati clinicamente a partire dagli anni '40 e rappresentano una delle principali classi di antimicrobici specificati per la medicina umana. Da allora, si sono

evolute centinaia di diverse β-lattamasi nei patogeni intestinali, il cui numero è piuttosto allarmante (>2000) e diversificato [75].

La resistenza alla penicillina di *K. pneumoniae* è stata riscontrata per la prima volta negli anni '60 e ha portato anche alla scoperta della prima classe di geni della β-lattamasi (*blaSHV-1* e *blaTEM-1*). Vent'anni dopo, il primo gene della β-lattamasi ad ampio spettro *blaSHV-2* è stato identificato in *K. pneumoniae* ottenuto da pazienti in terapia intensiva in Germania. Questo gene presenta un ampio spettro di attività di tolleranza ai β-lattamici (incluse le cefalosporine e le monocosammine) ed è stato definito il primo gene ESBL scoperto. Ben presto, un'altra variante ESBL mediata da plasmide, *blaTEM-3*, è stata trovata in *K. pneumoniae* in Francia [38]. Dall'emergere delle ESBL in *K. pneumoniae* nel periodo 1990-2000, è diventato il principale patogeno portatore di ESBL nei focolai di infezione nosocomiale. Dei ceppi clinici di *K. pneumoniae* presenti in tutti gli ospedali iracheni e spagnoli, il 40% dei ceppi sono ESBL [76]. In questo periodo, il ceppo di *K. pneumoniae* che contiene le principali β-lattamasi *blaTEM* e *blaSHV ha un'*elevata incidenza ed è prevalente in molti Paesi [77]. Nel 2000, grazie alla disponibilità di plasmidi e trasposoni che codificano le *ESBL* di tipo *blaCTX-M*, sono stati alterati i tipi di *ESBL* in *K. pneumoniae* causati da epidemie iatrogene [39]. Alcuni studi hanno rilevato che la resistenza ai β-lattamici può essere attivata da *ramA* e che l'eccessiva produzione di *ramA* in *K. pneumoniae* svolge un ruolo importante nel migliorare la resistenza ai β-lattamici mediata da β-lattamici già assunti. Le analisi proteomiche mostrano che questo miglioramento è ottenuto principalmente attivando la produzione di pompe di efflusso [40].

Un altro tipo di gene ESBL viene trasferito a *K. pneumoniae* attraverso il trasferimento genico orizzontale (HGT), tra cui le ESBL di tipo *blaOXA* [41] e i geni *blaGES* e *blaSFO* [42], o *blaPER*, *blaTLA* e *blaVEB* [43] e *blaKLUC-5* [44]. Inoltre, sono emersi geni di β-lattamasi tolleranti agli inibitori, che codificano enzimi parzialmente inibiti da tazobactam e acido clavulanico [75]. Nei 30 anni dalla loro comparsa, le *K. pneumonia* che producono ESBL sono aumentate in tutto il mondo. In base ai report

dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), *K. pneumoniae* con ESBL ha raggiunto un tasso di prevalenza del 50% in numerose parti del mondo e un tasso di resistenza del 30% nella comunità, il che indica la sua ubiquità di resistenza.

7.4.4 GENE DELLA RESISTENZA ALLA POLIMIXINA

La polimixina distrugge l'integrità della membrana spostando gli ioni extracellulari (Ca2+/Mg2+) con il legame al lipopolisaccaride (LPS) a carica negativa e causando la lisi cellulare [78]. La storia della resistenza alla polimixina *di K. pneumoniae* è più breve rispetto ad altri antibiotici, visto che il suo uso in medicina era limitato agli anni '80 e 2000. Clinicamente, il primo *Klebsiella aerogenes* resistente alla colistina (ora classificato come *Streptococcus pneumoniae*) è stato isolato sin dal primo utilizzo [79]. Nei primi anni 2000, con la comparsa di un numero sempre maggiore di ceppi di *K. pneumonia* XDR carbapenemasi (CPKP), la polimixina è diventata l'ultima classe di farmaci utilizzata [80]. La prima infezione nosocomiale di *K. pneumoniae* MDR non sensibile alla polimixina è stata riscontrata in Grecia nel 2004 [80]. Da allora, si sono moltiplicate le segnalazioni cliniche sull'emergere di ceppi resistenti.

Il meccanismo principale della resistenza alla polimixina *di K. pneumoniae* è la modifica del bersaglio mediante un meccanismo cromosomico, noto anche come "sistema di modifica dell'LPS". I ceppi con questo complesso sistema possono modificare la struttura dell'LPS e causare la riduzione dello ione negativo influenzando il legame con la polimixina [10]. Queste modifiche dell'LPS sono dovute a mutazioni nei geni centrali responsabili della maturazione del lipide A (*lpxM* e il suo regolatore *ramA*) [45,46] e della neutralizzazione del lipide A, l'amino arabinosio (*pbgP*, *pmrE*), una combinazione aggiuntiva di fosfoetanolammina (pmrC) o palmitato (*pagP*) [47,48]. Anche diversi regolatori genici modificati da LPS, come *phoPQ*, *pmrA* e *pmrD*, sono coinvolti nella resistenza alla polimixina. Anche le mutazioni in uno degli altri due geni regolatori (con conseguente sovraespressione

di *prmB* o inattivazione di *mgrB*) sono sufficienti a causare la resistenza alla polimixina [49,50]. Nel 2015, Wright et al. hanno riportato che un'altra via alla base della modificazione dell'LPS è rappresentata dai sistemi regolatori *TupA-like/glicosiltransferasi* e *CrrAB* [81]. Un altro meccanismo di resistenza alla colistina *di K. pneumoniae* è il polisaccaride capsulare (che può mimetizzare le molecole cariche sulla membrana esterna) [29], nonché l'elevata espressione delle pompe di efflusso *AcrAB-TolC* e *KpnEF* (dovuta alla regolazione positiva di *RarA*) [46]. Pal et al. hanno scoperto che la delezione della glicosiltransferasi *WcaJ* in *K. pneumoniae* fa sì che il ceppo mutante mostri un fenotipo non mucoso, che aumenta la resistenza alla polimixina [51]. La resistenza alla polimixina mediata da plasmidi è stata riportata solo di recente e il gene *mcr-1* è stato identificato in Cina. Questo gene codifica una famiglia di transferasi della fosfoetanolammina che condividono la stessa attività della PmrC e possono legarsi alla fosfoetanolammina [52]. Studi precedenti hanno dimostrato che la resistenza alla polimixina si verifica nei pazienti, piuttosto che essere causata dall'infezione, quindi limitare l'uso della polimixina può ridurre la resistenza alla polimixina *mediata da mcr-1* [82]. Lo screening fenotipico della resistenza acquisita alla polimixina mediata dal gene *mcr-1* comprende il test all'acido etilen-diamminotetraacetico (EDTA) e all'acido dipicolinico (DPA) [83] e il test alla MALDIxina [84].

7.4.5 GENE DI RESISTENZA ALLA TIGECICLINA

La tigeciclina è la prima generazione di gliciclina [85], utilizzata dal 2005 per il trattamento delle infezioni da *K. pneumoniae*. La tigeciclina è un farmaco promettente con attività antibatterica ad ampio spettro ed è efficace anche per i ceppi derivati da ESBL [86]. Poco dopo il primo utilizzo, in un ospedale è stato isolato un ceppo MDR di *K. pneumoniae* (sensibilità ridotta alla tigeciclina, MIC = 4 μg/mL) [87]. I meccanismi noti di tolleranza alla tigeciclina sono codificati a livello cromosomico e comprendono modifiche dei target delle unità ribosomiali 30S e 16S, nonché

cambiamenti nella permeabilità cellulare. Alcuni studi hanno dimostrato che la sovraespressione delle pompe di efflusso *AcrAB-TolC* e *OqxAB* e le variazioni dei livelli di espressione dei loro regolatori (*RamA*, *RamR, RarA* e *AcrR*) possono portare alla resistenza alla tigeciclina [53]. La mutazione del gene *RamR* può aumentare l'espressione di *RamA* [88]. Inoltre, anche i geni *Lon* e *rpsJ* sono stati associati alla resistenza alla tigeciclina in *K. pneumoniae* [54]. Anche la diminuzione dei livelli di trascrizione della porina *ompK35K* può portare a una maggiore resistenza dei ceppi di *K. pneumoniae [*55]. La prima mutazione nella proteina del ribosoma che causa una diminuzione della sensibilità si verifica nella proteina S10 *codificata da rpsJ* [89]. Le pompe di efflusso resistenti alla tetraciclina codificate dal gene *tetA* sono state trovate in isolati di *K. pneumoniae* non sensibili, ma il loro meccanismo di resistenza alla tigeciclina rimane poco chiaro [56].

7.5 APPLICAZIONE DEL SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA

Il sequenziamento dell'intero genoma consente un'identificazione approfondita dei batteri e fornirà uno strumento efficace per studiare e confrontare le infezioni e i focolai ospedalieri [90] e la sorveglianza epidemiologica [91]. Per comprendere meglio la virulenza e la prevalenza del ceppo *K. pneumoniae*, Brisse et al. hanno sviluppato un database gratuito BIGSdb-Kp [92], che può aiutare gli scienziati a ottenere rapidamente informazioni mediche ed epidemiologiche dalla sequenza del genoma di *K. pneumoniae*. Inoltre, diversi studi hanno utilizzato il sequenziamento high-throughput per ottenere e confrontare i genomi di ceppi endemici altamente virulenti (CG23) e quasi avirulenti MDR (CG258). Bialek-Davenet et al. hanno dimostrato che il ceppo CG258 è quasi privo di virulenza, ma presenta diversi geni associati alla resistenza ai farmaci, come i geni mutati *gyrA* e *parC* nella regione che determina la resistenza ai chinoloni. Nel frattempo, la maggior parte dei geni dei ceppi MDR e ad alta virulenza non si sovrappongono [92]. Struve et al. hanno dimostrato che il

ceppo clinico CG23 è un colonizzatore molto efficiente del tratto intestinale umano [93]. Hanno individuato grandi plasmidi di virulenza che codificano due vettori di ferro (batteriocina e salmochelina) in tutti i ceppi *hvKP* e hanno scoperto che questi ceppi hanno anche altri vettori di ferro, come la Yersina legata all'ICE, la colibactina e il microbatterio E492. Attualmente, l'applicazione del sequenziamento dell'intero genoma nel campo di *K. pneumoniae* comprende anche l'esplorazione della virulenza, della formazione di biofilm e del meccanismo di resistenza ai farmaci di *K. pneumoniae* a livello di genoma. Rimoldi et al. hanno scoperto che l'esistenza del gene *blaKPC* è correlata alla resistenza ai carbapenemi e alla relazione tra i pili di tipo 3 di *K. pneumoniae* e i geni trasportatori di ferro mediante il profilo del viruloma [94]. Meletis et al. hanno rivelato che il sierotipo capsulare *di K. pneumoniae* codificante NDM-1 è determinato dalla sequenza nucleotidica del gene *wzc*. Il genoma di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi comprende 16 geni di resistenza ai farmaci, 12 localizzati nei plasmidi e 4 nel cromosoma [95]. Founou et al. hanno sequenziato l'intero genoma di *K. pneumoniae* produttore di ESBL con la piattaforma Illumina MiSeq e hanno scoperto che ESBL-K. *pneumoniae* contiene una varietà di geni di β-lattamasi, tra cui *blaOXA-1*, *blaTEM-1b*, *blaSHV-1*, *blaCTX-M-15* e altri geni di resistenza ai farmaci. Sono stati rilevati anche tipi di plasmidi repliconi di ESBL-K. *pneumoniae* [96]. In generale, il sequenziamento dell'intero genoma è stato utilizzato in vari settori dello studio di *K. pneumoniae* e riteniamo che in futuro diventerà uno strumento importante per questo studio.

7.6 APPLICAZIONE DELLA PROTEOMICA GLOBALE

La proteomica è stata ampiamente utilizzata in importanti aspetti del campo batteriologico, ad esempio nell'identificazione dei batteri [97] e nello sviluppo di vaccini [98]. Questa tecnica può aiutarci ad analizzare meglio i meccanismi molecolari dell'infezione batterica e dell'interazione batterio-ospite [99]. Kamaladevi et al. hanno dimostrato che *K. pneumoniae* influisce

principalmente sulla via metabolica dell'ospite durante l'infezione e ulteriori esperimenti hanno dimostrato che *K. pneumoniae* distrugge il sistema di difesa dell'ospite inibendo la via PI3K/AKT/mTOR [100]. Si è usata la proteomica per studiare il meccanismo della resistenza ai farmaci di *K. pneumoniae*. Sharma et al. hanno applicato metodi proteomici (LC-MS/MS) e bioinformatici per analizzare la possibile relazione tra *K. pneumoniae* e la resistenza ai carbapenemi, scoprendo che 52 proteine sovraespresse correlate e le loro proteine interattive possono aver contribuito alla sopravvivenza di *K. pneumoniae* sotto stress da meropenem e all'emergere della resistenza al meropenem attraverso meccanismi diversi o vie multiple [101]. L'applicazione della proteomica può essere utilizzata anche come trattamento efficace per *K. pneumoniae*. Anand et al. hanno utilizzato SDS-PAGE e NLC-MS/MS per scoprire che la terapia fagica di *K. pneumoniae* attraverso l'approccio nasale è una misura efficace [102]. Pertanto, possiamo ritenere che l'applicazione della proteomica porterà ulteriori progressi nel campo di *K. pneumoniae*.

7.7 STUDIO CLINICO DI K. PNEUMONIAE

Per evitare la diffusione su larga scala di *K. pneumoniae*, è necessario condurre una sorveglianza epidemiologica, soprattutto per i ceppi ampiamente resistenti agli antibiotici [103]. Zhang et al. hanno riportato uno studio retrospettivo caso-controllo su 138 campioni clinici con infezioni del flusso sanguigno (BSI) da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CRKP). Hanno concluso che le neoplasie ematologiche (odds ratio (OR) = 4,712, (95% CI = 2,181-10,180), $p < 0,001$) e l'uso di cefalosporine (OR = 3,427, (95% CI = 1,513-7,766), $p = 0,003$) erano correlate all'insorgenza di BSI da CRKP, mentre lo shock settico (OR = 6,418, (95% CI = 1,513-7,766), $p = 0,003$).418, (95% CI = 1.342-30.686), $p = 0.020$), la ventilazione meccanica (OR = 9.502, (95% CI = 2.098-43.033), $p = 0.003$) e l'infezione da CRKP (OR = 9.171, (95% CI = 1.546-54.416), $p = 0.015$) sono stati predittori indipendenti di mortalità per *K. pneumoniae* BSI [104]. Coeren-

temente con questo risultato, Demir et al. hanno scoperto che i predittori indipendenti più forti di colonizzazione ESBL-K. *pneumoniae* erano la ventilazione meccanica (OR = 4,28, p = 0,000) e l'ospedalizzazione per più di 14 giorni (OR = 6,97, p = 0,000) attraverso la ricerca nei reparti pediatrici [105]. La colonizzazione gastrointestinale è considerata il fattore di rischio dell'infezione da *K. pneumoniae* nei pazienti in terapia intensiva [106]. Gorrie et al. hanno condotto uno studio prospettico di coorte della durata di 1 anno su 498 pazienti in terapia intensiva. Hanno rilevato che la colonizzazione di *K. pneumoniae* è un importante fattore di rischio per l'infezione in terapia intensiva (OR = 6,9, p < 0,001). Circa il 50% delle infezioni da *K. pneumoniae* proviene dal microbiota del paziente stesso [107].

7.8 CONCLUSIONI

K. pneumoniae è recentemente diventato noto come fattore di virulenza, a causa dell'aumento del numero di pazienti gravemente infetti. Considerando la diversità evolutiva dei ceppi clinici, si ritiene che molti modelli di infezione, tra cui la polmonite, l'ascesso epatico e la colonizzazione gastrointestinale, nonché diversi ceppi, possano essere meglio conosciuti per questi patogeni. Fortunatamente sono stati riportati sempre più studi che utilizzano metodi high-throughput per identificare i fattori virulenti come un modo relativamente semplice per esplorare le risposte immunitarie innate e i fattori virulenti. Ciononostante non sappiamo ancora come *K. pneumoniae* interagisca con i diversi componenti delle risposte immunitarie innate, come i suoi fattori virulenti superino le risposte dell'ospite e permettano a *K. pneumoniae* di replicarsi e costruire nicchie e come accelerare la trasformazione del meccanismo di resistenza agli antibiotici nella ricerca e nella strategia di trattamento clinico. Riteniamo che saranno ulteriori studi sulla biologia, la fisiologia e le interazioni con l'ospite di *K. pneumoniae* a fornire importanti indizi per combattere l'infezione da *K. pneumoniae*.

8 - BIOLOGIA DELL'*ACINETOBACTER BAUMANNII*: PATOGENESI, MECCANISMI DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E OPZIONI TERAPEUTICHE FUTURE

Tratto e tradotto da

Lee C.R., Lee J.H., Park M., Park K.S., Bae I.K., Kim Y.B., Cha C.J., Jeong B.C., Lee S.H., *Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options.* Front Cell Infect Microbiol. 2017 Mar 13;7:55.

doi:10.3389/fcimb.2017.00055

Abstract

È noto che l'*Acinetobacter baumannii* sia uno degli agenti patogeni responsabili delle infezioni nosocomiali acquisite in ospedale nel sistema sanitario moderno. A causa della prevalenza di infezioni ed epidemie causate da *A. baumannii* multiresistente, pochi antibiotici sono efficaci per il trattamento delle infezioni causate da questo patogeno. Per superare questo problema è importante conoscere la patogenesi e i meccanismi di resistenza agli antibiotici di *A. baumannii*. In questa rassegna riassumiamo gli studi attuali sui fattori di virulenza che contribuiscono alla patogenesi *di A. baumannii*, tra cui porine, polisaccaridi capsulari, lipopolisaccaridi, fosfolipasi, vescicole della membrana esterna, sistemi di acquisizione dei metalli e sistemi di secrezione delle proteine. Vengono inoltre discussi i meccanismi di resistenza agli antibiotici di questo organismo, tra cui l'acquisizione di β-lattamasi, l'up-regulation delle pompe di efflusso multifarmaco, la modifica degli aminoglicosidi, i difetti di permeabilità e l'alterazione dei siti bersaglio. Infine, vengono riassunte le nuove opzioni terapeutiche prospettiche per le infezioni causate da *A. baumannii* multiresistente.

8.1 INTRODUZIONE

Gli Acinetobacter spp. sono coccobacilli Gram-negativi che non fermentano il glucosio, non mobili, non fastidiosi, catalasi-positivi, ossidativi-negativi, aerobi (Lin e Lan, 2014). A causa dei gruppi di specie strettamente correlate, è difficile distinguere la tassonomia di *Acinetobacter* utilizzando tratti fenotipici e metodi chemiotassonomici. Poiché la suscettibilità agli antibiotici e la rilevanza clinica sono significativamente diverse tra le varie specie genomiche, è necessaria un'identificazione esatta delle specie di *Acinetobacter* (Bergogne-Berezin e Towner, 1996; Dijkshoorn et al., 1996; Houang et al., 2003; Lee et al., 2007).

Sono stati sviluppati molti metodi di fingerprinting genomico, tra cui la reazione a catena della polimerasi basata sulla sequenza extragenica ripetitiva (rep-PCR), l'elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE), la spettrometria di massa con desorbimento laser assistito da matrice (MALDI-TOF), la ribotipizzazione, l'analisi di restrizione del DNA ribosomiale amplificato, analisi del DNA polimorfico amplificato casuale, tipizzazione di sequenza multilocalizzata (MLST), fingerprinting dello spaziatore dell'RNA, analisi del polimorfismo di lunghezza del frammento amplificato e analisi della sequenza delle regioni dello spaziatore intergene del 16S-23S rRNA o dei geni *rpoB* e *gyrB* (Koeleman et al., 1998; Chang et al., 2005; La Scola et al., 2006; Croxatto et al., 2012; Higgins et al., 2012; Lee C. R. et al., 2015; Li X. M. et al., 2016).

Tra le specie di *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii* è il membro più importante associato alle infezioni nosocomiali in tutto il mondo (Lin e Lan, 2014). Questo coccobacillo Gram-negativo aerobio è stato considerato un patogeno di basso grado, ma è un patogeno di successo responsabile di infezioni opportunistiche della pelle, del flusso sanguigno, del tratto urinario e di altri tessuti molli (Peleg et al., 2008).

Dato che sono state segnalate delle infezioni *da A. baumannii* di massa tra i veterani e i soldati che hanno prestato servizio in Iraq e in Afghanistan (Centers for Disease and Prevention,

2004), *A. baumannii* viene definito "Iraqibacter". L'*A. baumannii* multiresistente (MDR) si è diffuso negli ospedali civili anche a causa dei pazienti militari feriti nelle zone di guerra e rimpatriati (Peleg et al., 2008). La maggior parte delle infezioni da *A. baumannii* si verifica in pazienti gravemente malati in unità di terapia intensiva (ICU) (Fournier e Richet, 2006) e rappresenta fino al 20% delle infezioni in ICU in tutto il mondo (Vincent et al., 2009).

Inoltre, la frequenza delle infezioni comunitarie da *A. baumannii* è aumentata progressivamente (Lin e Lan, 2014). Le analisi genomiche e fenotipiche hanno permesso di identificare diversi fattori di virulenza, tra cui le porine della membrana esterna, le fosfolipasi, le proteasi, i lipopolisaccaridi (LPS), i polisaccaridi capsulari, i sistemi di secrezione proteica e i sistemi ferrochelanti (Antunes et al., 2011; McConnell et al., 2013; Lin e Lan, 2014).

Molti rapporti hanno dimostrato che *A. baumannii* sviluppa rapidamente resistenza agli antimicrobici e ne sono stati isolati dei ceppi multiresistenti ai farmaci (McConnell et al., 2013). L'OMS ha dichiarato che *A. baumannii* è uno dei più gravi organismi ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, A. baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* species) che sfuggono efficacemente agli effetti dei farmaci antibatterici (Boucher et al., 2009).

Sono noti diversi meccanismi di resistenza *di A. baumannii*, tra cui la degradazione enzimatica dei farmaci, le modifiche del bersaglio, le pompe di efflusso multifarmaco e i difetti di permeabilità (Gordon e Wareham, 2010; Kim et al., 2012; Lin e Lan, 2014). In questa rassegna riassumiamo i fattori di virulenza di *A. baumannii*, i meccanismi di resistenza agli antibiotici e le opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento delle infezioni da *A. baumannii*. La Figura 1 illustra tutte le caratteristiche descritte in questa rassegna.

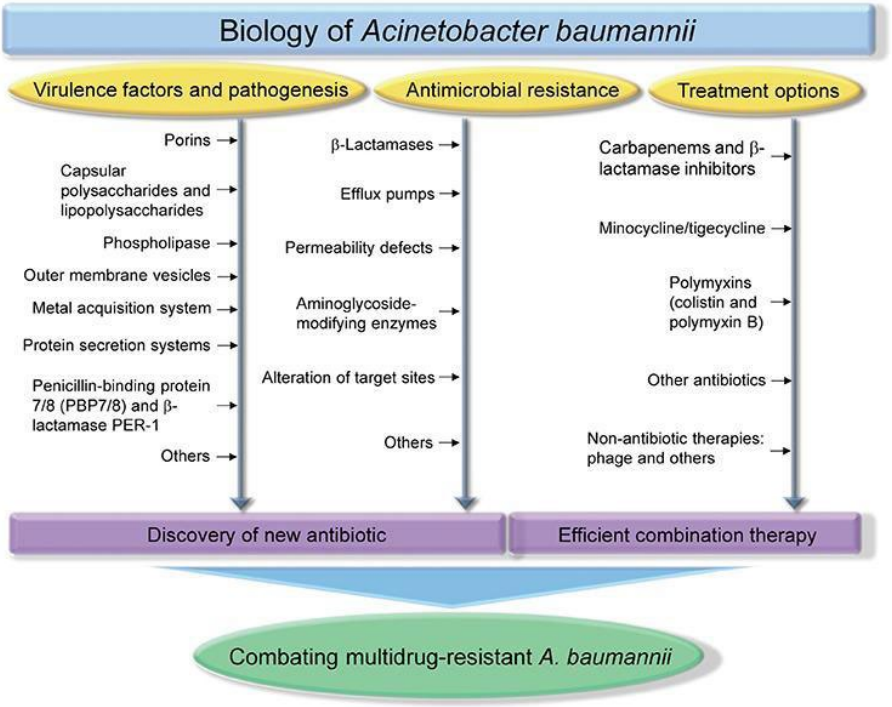


FIGURA 1. Biologia di Acinetobacter Baumannii. *Gli studi sui fattori di virulenza, la patogenesi, la resistenza agli antimicrobici e le opzioni terapeutiche di A. baumannii forniranno un importante aiuto per la scoperta di nuovi antibiotici e la scelta di un'efficace terapia di combinazione, strategie essenziali per combattere le infezioni da A. baumannii multiresistenti.*

8.2 FATTORI DI VIRULENZA E PATOGENESI DELL'*ACINETOBACTER BAUMANNII*

Sebbene le analisi genomiche e fenotipiche più recenti di *A. baumannii* abbiano identificato diversi fattori di virulenza responsabili della sua patogenicità, sono stati identificati relativamente pochi fattori di virulenza in *A. baumannii*, rispetto a quelli di altri

patogeni Gram-negativi (McConnell et al., 2013). I fattori di virulenza proposti per *A. baumannii* sono riassunti nella Tabella 1.

Virulence factor	Proposed role in pathogenesis	References
Porin (OmpA, Omp33-36, Omp22, CarO, OprD-like)	Adherence and invasion, induction of apoptosis, serum resistance, biofilm formation, persistence	Choi et al., 2005, 2008b; Gaddy et al., 2009; Kim et al., 2009; Lee et al., 2010; Fernandez-Cuenca et al., 2011; Smani et al., 2012, 2013; Rumbo et al., 2014; Wang et al., 2014; Huang et al., 2016
Capsular polysaccharide	Growth in serum, survival in tissue infection, biofilm formation	Russo et al., 2010; Iwashkiw et al., 2012; Lees-Miller et al., 2013
Lipopolysaccharide (LPS)	Serum resistance, survival in tissue infection, evasion of the host immune response	Luke et al., 2010; Lin et al., 2012; McQueary et al., 2012; McConnell et al., 2013
Phospholipase (PLC and PLD)	Serum resistance, invasion, *in vivo* survival	Camarena et al., 2010; Jacobs et al., 2010; Stahl et al., 2015; Fiester et al., 2016
Outer membrane vesicle (OMV)	Delivery of virulence factors, horizontal transfer of antibiotic resistance gene	Kwon et al., 2009; Jin et al., 2011; Rumbo et al., 2011; Moon et al., 2012; Jun et al., 2013; Li Z. T. et al., 2015
Iron acquisition system (acinetobactin and NfuA)	*In vivo* survival, persistence, killing of host cells	Gaddy et al., 2012; Penwell et al., 2012; Zimbler et al., 2012; Fiester et al., 2016; Megeed et al., 2016
Zinc acquisition system (ZnuABC and ZigA)	*In vivo* survival	Hood et al., 2012; Nairn et al., 2016
Manganese acquisition system (MumC and MumT)	*In vivo* survival	Juttukonda et al., 2016
Type II protein secretion system	*In vivo* survival	Johnson et al., 2015; Elhosseiny et al., 2016; Harding et al., 2016
Type VI protein secretion system	Killing of competing bacteria, host colonization	Carruthers et al., 2013; Wright et al., 2014; Jones et al., 2015; Repizo et al., 2015; Ruiz et al., 2015
Type V protein secretion system	Biofilm formation, adherence	Bentancor et al., 2012b
Penicillin-binding protein 7/8 and β-lactamase PER-1	Serum resistance, *in vivo* survival, adherence	Sechi et al., 2004; Russo et al., 2009
CipA	Serum resistance, invasion	Koenigs et al., 2016
Tuf	Serum resistance	Koenigs et al., 2015
RecA	*In vivo* survival	Aranda et al., 2011
SurA1	Serum resistance, *in vivo* survival	Liu D. et al., 2016
GigABCD	*In vivo* survival, killing of host cells	Gebhardt et al., 2015
UspA	*In vivo* survival, killing of host cells	Elhosseiny et al., 2015; Gebhardt et al., 2015
GacS and PaaE	Neutrophil influx	Cerqueira et al., 2014; Gebhardt et al., 2015; Bhuiyan et al., 2016
Pili	Adherence, biofilm formation	Tomaras et al., 2003, 2008
OmpR/EnvZ	Killing of host cells	Tipton and Rather, 2016
FhaBC	Adherence, killing of host cells	Perez et al., 2016
AbeD	Killing of host cells	Srinivasan et al., 2015

TABELLA 1. *Fattori di virulenza identificati di Acinetobacter Baumannii*

8.2.1 PORINE

Le porine sono proteine della membrana esterna associate alla modulazione della permeabilità cellulare. OmpA è una porina a β-barile e una delle porine più abbondanti nella membrana esterna. In *A. baumannii*, OmpA è un fattore di virulenza molto

ben caratterizzato, con una serie di interessanti proprietà biologiche identificate in sistemi modello in *vitro* (Smith et al., 2007; McConnell et al., 2013). Uno screening di mutagenesi casuale ha dimostrato che il mutante di *A. baumannii ompA* è difettoso nell'indurre apoptosi nelle cellule epiteliali umane (Choi et al., 2005). L'OmpA purificato si lega alle cellule epiteliali dell'ospite, prende di mira i mitocondri e induce l'apoptosi rilasciando molecole pro-apoptotiche, come il citocromo c e il fattore di induzione dell'apoptosi (Choi et al., 2005; Lee et al., 2010). Un altro studio ha dimostrato che OmpA trasloca nel nucleo grazie a un nuovo segnale di localizzazione nucleare monopartito e induce la morte cellulare (Choi et al., 2008a). OmpA svolge anche un ruolo importante nell'adesione e nell'invasione delle cellule epiteliali interagendo con la fibronectina (Choi et al., 2008b; Gaddy et al., 2009; Smani et al., 2012) e si lega al fattore H nel siero umano (Kim et al., 2009), il che potrebbe consentire ad *A. baumannii* di evitare l'uccisione mediata dal complemento. Il gene *ompA* è necessario per la persistenza di *A. baumannii* nel polmone di topo (Wang et al., 2014).

Inoltre, OmpA è anche coinvolta nella resistenza antimicrobica di *A. baumannii* (Sugawara e Nikaido, 2012; Smani et al., 2014). La principale porina di *A. baumannii* è OmpA, che ha un'attività di formazione dei pori 70 volte inferiore a quella di OmpF (Sugawara e Nikaido, 2012). Inoltre, l'interruzione del gene *OmpA* riduce significativamente le concentrazioni minime inibitorie (MIC) di diversi antibiotici (cloramfenicolo, aztreonam e acido nalidixico), suggerendo che OmpA partecipa all'estrusione degli antibiotici dallo spazio periplasmatico attraverso la membrana esterna e si accoppia con i sistemi di efflusso della membrana interna (Smani et al., 2014). OmpA aumenta la sopravvivenza e la persistenza di *A. baumannii* facilitando la motilità superficiale e la formazione di biofilm (Gaddy et al., 2009; Clemmer et al., 2011; McConnell et al., 2013). OmpA regola anche la biogenesi delle vescicole della membrana esterna (Moon et al., 2012). Questi risultati suggeriscono che la proteina OmpA è un bersaglio interessante per lo sviluppo di nuovi antibiotici e

strategie di prevenzione. Due recenti rapporti basati sull'immuno-proteomica e sulla vaccinologia inversa hanno suggerito che OmpA è un potenziale candidato al vaccino contro *A. baumannii* (Fajardo Bonin et al., 2014; Hassan et al., 2016). In effetti, la proteina OmpA è immunogenica in individui sani e in pazienti con infezioni invasive *da A. baumannii* (Zhang et al., 2016). In un modello murino di infezione da *A. baumannii*, i topi immunizzati con OmpA presentavano un tasso di sopravvivenza significativamente più elevato rispetto ai topi di controllo (Luo et al., 2012; Lin L. et al., 2013; Zhang et al., 2016).

La proteina Omp da 33 a 36 kDa (Omp33-36), che agisce come canale di passaggio dell'acqua, è un'altra porina della membrana esterna associata alla citotossicità di *A. baumannii* (Smani et al., 2013; Rumbo et al., 2014). La delezione del ceppo *omp33-36* riduce significativamente l'adesione e l'invasione di cellule epiteliali polmonari umane e la citotossicità verso queste cellule (Smani et al., 2013). La delezione del gene *omp33-36* in un modello di sepsi murina attenua la letalità e riduce le concentrazioni batteriche nella milza e nei polmoni (Smani et al., 2013). Uno studio ha dimostrato che l'Omp33-36 purificato induce l'apoptosi in diversi tipi di cellule, comprese quelle immunitarie e del tessuto connettivo, attivando le caspasi e modulando l'autofagia (Rumbo et al., 2014). Omp33-36 è anche coinvolto nella resistenza agli antibiotici. Il ceppo JC10/01 di *A. baumannii* resistente agli antibiotici carbapenemi (imipenem e meropenem) presenta una perdita di Omp33-36 e l'espressione episomiale di Omp33-36 in questo ceppo riduce chiaramente le MIC di imipenem e meropenem (del Mar Tomas et al., 2005).

L'Omp22 è stato identificato come un antigene nuovo, conservato e sicuro per lo sviluppo di vaccini efficaci per il controllo delle infezioni *da A. baumannii* (Huang et al., 2016), anche se il contributo dell'Omp22 alla patogenicità *di A. baumannii* non è stato determinato. L'immunizzazione attiva e passiva con Omp22 aumenta il tasso di sopravvivenza dei topi, sopprime la carica batterica negli organi e nel sangue periferico e riduce i livelli sierici di citochine e chemochine infiammatorie (Huang

et al., 2016). Anche altre porine, come la proteina di membrana esterna associata ai carbapenemi (CarO) e la OprD-like, sono fattori di virulenza associati a una virulenza attenuata in un modello murino (Fernandez-Cuenca et al., 2011).

8.2.2 POLISACCARIDI CAPSULARI E LIPOPOLISACCARIDI (LPS)

Oltre all'OmpA, l'involucro di *A. baumannii* è associato a molti fattori che contribuiscono alla patogenicità. Tra questi, gli esopolisaccaridi capsulari e l'LPS sono fattori di patogenicità *di A. baumannii*. In particolare, molti isolati di pazienti con infezioni *da A. baumannii* esprimono polisaccaridi capsulari di superficie e contengono un cluster genico conservato, chiamato locus K, che può determinare la produzione di polisaccaridi capsulari (Koeleman et al., 2001; Hu et al., 2013; Kenyon e Hall, 2013; Geisinger e Isberg, 2015). Uno screening casuale dei trasposoni per identificare i geni essenziali per la crescita in un liquido essudativo infiammatorio ha portato all'identificazione dei geni *ptk* ed *epsA*, che dovrebbero essere necessari per la polimerizzazione e l'assemblaggio della capsula (Russo et al., 2010). I mutanti *ptk* ed *epsA* sono carenti nella produzione di capsule e presentano un difetto di crescita nel siero umano, con conseguente riduzione altamente significativa della sopravvivenza nei siti di infezione dei tessuti molli (Russo et al., 2010). Anche le mutazioni nei geni *pglC* o *pglL*, responsabili della sintesi dell'*O-pentasaccaride* presente nelle glicoproteine e nei polisaccaridi capsulari, attenuano la letalità in un modello di setticemia murina e formano strutture di biofilm anomale (Iwashkiw et al., 2012; Lees-Miller et al., 2013). Pertanto, i polisaccaridi capsulari sono stati proposti come bersaglio per interventi protettivi basati sugli anticorpi (immunizzazione passiva; Russo et al., 2013).

Uno studio ha dimostrato che i polisaccaridi capsulari sono coinvolti nella resistenza antimicrobica di *A. baumannii* (Geisinger e Isberg, 2015). I mutanti carenti di polisaccaridi capsulari presentano una minore resistenza intrinseca agli antibiotici peptidici. Inoltre, la presenza di antibiotici induce un'iperproduzio-

ne di polisaccaridi capsulari (Geisinger e Isberg, 2015). La produzione di polisaccaridi capsulari indotta dagli antibiotici aumenta la resistenza all'uccisione da parte del complemento dell'ospite e la virulenza in un modello murino di infezione sistemica (Geisinger e Isberg, 2015). Questo studio ha anche dimostrato che l'aumento della produzione di capsule dopo l'esposizione a un antibiotico dipende da un aumento di trascrizione dell'espressione dei geni del locus K e che l'espressione dei geni del locus K è regolata dal sistema di regolazione bicomponente *bfmRS* (Geisinger e Isberg, 2015). *bfmR* è un gene essenziale per la crescita nell'ascite umana, essendo un mezzo *ex vivo* che riflette l'ambiente di infezione (Umland et al., 2012), ed è importante per la persistenza nel polmone in un modello di polmonite murina (Wang et al., 2014). BfmS è anche un fattore di virulenza che svolge un ruolo importante nella formazione del biofilm, nell'adesione alle cellule eucariotiche e nella resistenza al siero umano (Liou et al., 2014). Un rapporto ha mostrato la resistenza mediata da BfmR all'attività battericida mediata dal complemento e la resistenza agli antimicrobici clinicamente importanti (meropenem e colistina; Russo et al., 2016). Tuttavia, questo studio ha suggerito che gli effetti del BfmR sono indipendenti dalla produzione di polisaccaridi capsulari. Pertanto, la relazione tra BfmRS e polisaccaridi capsulari deve essere descritta in modo più dettagliato.

L'LPS è il componente principale del foglietto esterno della membrana esterna della maggior parte dei batteri Gram-negativi ed è una molecola immunoreattiva che induce il rilascio del fattore di necrosi tumorale e dell'interleuchina 8 dai macrofagi in modo dipendente dal recettore Toll-like 4 (TLR4) (Erridge et al., 2007). L'LPS è composto da una parte lipidica endotossica A, un nucleo oligosaccaridico e un antigene O ripetitivo (Lee et al., 2013b). In *A. baumannii*, l'LPS svolge un ruolo fondamentale nella virulenza e nella sopravvivenza di *A. baumannii* (Luke et al., 2010; Lin et al., 2012; McQueary et al., 2012). Le cellule mutanti prive della glicotransferasi LpsB presentano una glicoforma di LPS altamente tronca, contenente solo due residui di carboidrati legati al lipide A, con conseguente riduzione della resistenza

al siero umano e della sopravvivenza in un modello di ratto di infezione dei tessuti molli (Luke et al., 2010; McConnell et al., 2013). L'inibizione di LpxC, un enzima coinvolto nella biosintesi del lipide A, non inibisce la crescita del batterio, ma sopprime l'attivazione di TLR4 mediata da LPS di *A. baumannii* (Lin et al., 2012). L'inibizione di LpxC nel modello murino aumenta la clearance di *A. baumannii* potenziando l'uccisione opsonofagocitica e riduce la concentrazione di LPS nel siero e l'infiammazione, proteggendo completamente i topi dall'infezione letale (Lin et al., 2012; Lee et al., 2013b). Questi risultati indicano che il blocco della sintesi di LPS è una buona strategia per scoprire nuovi antibiotici. La modifica dell'LPS contribuisce alla resistenza agli antimicrobici. Molti studi hanno dimostrato che le modifiche dell'LPS diminuiscono la suscettibilità di *A. baumannii* a molti antibiotici di importanza clinica, come la colistina (Moffatt et al., 2010; Arroyo et al., 2011; Beceiro et al., 2011; Pelletier et al., 2013; Boll et al., 2015; Chin et al., 2015).

8.2.3 FOSFOLIPASI

La fosfolipasi è un enzima lipolitico essenziale per il metabolismo dei fosfolipidi ed è un fattore di virulenza in molti batteri, come *P. aeruginosa, Legionella monocytogenes* e *Clostridium perfringens* (Camarena et al., 2010; Flores-Diaz et al., 2016). In base al sito di clivaggio sono state definite tre classi di fosfolipasi: la fosfolipasi A (PLA), la fosfolipasi C (PLC) e la fosfolipasi D (PLD). La PLA idrolizza gli acidi grassi dalla spina dorsale del glicerolo, mentre la PLC scinde il gruppo di testa fosforilato dal fosfolipide. La PLD è una transfosfatidilasi che scinde solo il gruppo di testa. La degradazione dei fosfolipidi influisce sulla stabilità delle membrane delle cellule ospiti e il gruppo di testa scisso può interferire con la segnalazione cellulare, provocando cambiamenti nella risposta immunitaria dell'ospite (Songer, 1997; Flores-Diaz et al., 2016). La PLC e la PLD sono state identificate come fattori di virulenza in *A. baumannii* (Camarena et al., 2010; Jacobs et al., 2010; Stahl et al., 2015). *Acinetobacter baumannii* ATCC17978

possiede due PLC (A1S_0043 e A1S_2055) e l'inattivazione del gene A1S_0043 porta a una modesta riduzione dell'effetto citotossico di *A. baumannii* sulle cellule epiteliali rispetto a quello del ceppo parentale (Camarena et al., 2010; Fiester et al., 2016). L'interruzione di uno (A1S_2989) dei due geni PLD presenti nel ceppo 98-37-09 di *A. baumannii* determina una ridotta resistenza al siero umano, una minore capacità di invadere le cellule epiteliali e una minore virulenza in un modello murino di polmonite (Jacobs et al., 2010). Un altro report ha dimostrato che *A. baumannii* ATCC 19606 possiede tre geni PLD e tutti e tre svolgono ruoli importanti nella virulenza e nell'invasione delle cellule ospiti in modo concertato (Stahl et al., 2015). Questi risultati suggeriscono che gli enzimi fosfolipasi sono importanti fattori di virulenza nella patogenesi *di A. baumannii*.

8.2.4 VESCICOLE DELLA MEMBRANA ESTERNA (OMV)

Le OMV sono vescicole sferiche di 20-200 nm di diametro secrete dalle membrane esterne di vari batteri patogeni Gram-negativi (Kulp e Kuehn, 2010). Sono composte da LPS, proteine della membrana esterna e periplasma, fosfolipidi e DNA o RNA e sono riconosciute come veicoli di trasporto di effettori batterici verso le cellule ospiti (Ellis e Kuehn, 2010). Le OMV veicolano contemporaneamente diversi fattori di virulenza all'interno delle cellule dell'ospite e consentono ai patogeni di interagire con l'ospite senza uno stretto contatto tra batteri e cellule dell'ospite (Jun et al., 2013). Molti ceppi di *A. baumannii* secernono OMV contenenti vari fattori di virulenza, tra cui OmpA (Kwon et al., 2009; Jin et al., 2011; Moon et al., 2012), proteasi (Kwon et al., 2009) e fosfolipasi (Kwon et al., 2009). Le OMV derivate da *A. baumannii* interagiscono con le cellule dell'ospite e vi trasportano gli effettori batterici attraverso le zattere lipidiche, con conseguente citotossicità (Jin et al., 2011). Le OMV purificate di *A. baumannii* ATCC 19606 inducono a seconda della dose l'espressione di geni di citochine pro-infiammatorie nelle cellule epiteliali (Jun et al., 2013). In particolare, le OMV trattate con protei-

nasi non inducono un aumento significativo dell'espressione dei geni delle citochine pro-infiammatorie; ciò suggerisce che le proteine di membrana delle OMV sono responsabili dell'attivazione di una potente risposta immunitaria innata (Jun et al., 2013). Uno studio sostiene il ruolo delle OMV nella patogenesi *di A. baumannii*. Un ceppo di *A. baumannii* che produce abbondanti OMV con più fattori di virulenza induce una risposta immunitaria innata più forte e più citotossica rispetto a quella di un ceppo che produce meno OMV (Li Z. T. et al., 2015).

Data l'importanza delle OMV nella virulenza *di A. baumannii*, diversi report hanno dimostrato che le OMV di *A. baumannii* potrebbero essere utilizzate come vaccino acellulare per aumentare l'immunità protettiva (McConnell et al., 2011; Huang et al., 2014). In un modello murino di sepsi disseminata, la vaccinazione con OMV del ceppo *A. baumannii* ATCC 19606 protegge i topi dalla sfida con batteri omologhi e fornisce protezione contro altri isolati clinici (McConnell et al., 2011). Sono stati ottenuti dei risultati simili in un modello murino di polmonite. La carica batterica, l'infiltrazione di cellule infiammatorie e l'accumulo di citochine infiammatorie nel modello di polmonite sono stati significativamente soppressi dall'immunizzazione attiva e passiva con OMVs (Huang et al., 2014). Questi risultati indicano che le OMV di *A. baumannii* possono essere utilizzate come vaccino acellulare per controllare efficacemente le infezioni da *A. baumannii*. È interessante notare che le OMV di *A. baumannii* sono anche correlate alla diffusione della resistenza agli antibiotici e inducono il trasferimento orizzontale del gene della carbapenemasi OXA-24 (Rumbo et al., 2011).

8.2.5 SISTEMA DI ACQUISIZIONE DEI METALLI

Sebbene il ferro sia uno degli elementi più abbondanti nei sistemi ambientali e biologici, il ferro allo stato ferrico è relativamente indisponibile per i batteri nello stato da essi preferito, a causa della sua scarsa solubilità (limite di solubilità 10-17 M per il ferro ferrico) in condizioni aerobiche e di pH neutro e a causa

della chelazione da parte di composti a basso peso molecolare, come l'eme, o di composti ad alta affinità di legame con il ferro, come la lattoferrina e la transferrina (Rakin et al., 2012; Saha et al., 2013). Per superare questa limitazione del ferro, la maggior parte dei batteri aerobi produce un chelante del ferro ad alta affinità noto come sideroforo (Saha et al., 2013). I siderofori sono composti a basso peso molecolare (400-1.000 kDa) con elevata affinità al ferro. L'intervallo delle costanti di associazione Fe3+-sideroforo è 1012-1052 (Saha et al., 2013). I siderofori sono stati classificati in catecolati, idrossimati e di tipo misto, in base al contenuto di ligandi dell'ossigeno che coordinano il Fe3+ (Saha et al., 2013). Anche *Acinetobacter baumannii* possiede siderofori di ferro e l'acinetobactina, il sideroforo di *A. baumannii* meglio caratterizzato, è un sideroforo di tipo misto con un anello ossazolino derivato dalla treonina (McConnell et al., 2013). L'acinetobactina è un fattore di virulenza *di A. baumannii* (Gaddy et al., 2012; Penwell et al., 2012; Megeed et al., 2016). L'alterazione delle funzioni di biosintesi e trasporto dell'acinetobactina riduce significativamente la capacità di *A. baumannii* ATCC 19606 di persistere all'interno delle cellule epiteliali e di causare danni nelle cellule e morte negli animali (Gaddy et al., 2012). Anche la mutazione del gene *entA*, essenziale per la biosintesi del precursore dell'acinetobactina, l'acido 2,3-diidrossibenzoico, riduce significativamente la capacità delle cellule di *A. baumannii* ATCC 19606 di persistere all'interno delle cellule epiteliali alveolari umane e diminuisce la capacità di infettare e uccidere le larve *di Galleria mellonella* (Penwell et al., 2012). Uno studio ha dimostrato che la produzione di acinetobactina è significativamente più frequente negli isolati di *A. baumannii* MDR rispetto agli isolati avirulenti (Megeed et al., 2016).

Anche la proteina scaffold Fe-S di *A. baumannii* NfuA, che partecipa alla formazione di cluster di Fe-S e svolge un ruolo nelle risposte delle cellule alla chelazione del ferro e allo stress ossidativo, è stata identificata come fattore di virulenza (Zimbler et al., 2012). Il mutante *nfuA* è più sensibile alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come il perossido di idrogeno e l'idroperos-

sido di cumene, e mostra una crescita significativamente ridotta nelle cellule epiteliali umane. Inoltre, un modello di infezione di G. *mellonella* ha mostrato che più del 50% delle larve di G. *mellonella* iniettate muoiono 6 giorni dopo l'infezione con il ceppo parentale, mentre meno del 30% delle larve muoiono se infettate con il mutante *nfu*A (Zimbler et al., 2012). Un report ha dimostrato che la fame di ferro aumenta la produzione di PLC, che incrementano l'attività emolitica di *A. baumannii* (Fiester et al., 2016). Queste relazioni indicano che le funzioni di acquisizione del ferro svolgono un ruolo critico nella virulenza di *A. baumannii*.

La calprotectina, proteina chelante dei metalli dell'immunità innata, inibisce la crescita batterica attraverso la chelazione mediata dall'ospite di metalli, come lo zinco (Zn2+ e Zn) e il manganese (Mn2+ e Mn) (Corbin et al., 2008). Tuttavia, *A. baumannii* può causare malattie in presenza di questa proteina immunitaria nutrizionale *in vivo* (Juttukonda et al., 2016). Per combattere la limitazione dello zinco, *A. baumannii* utilizza un sistema di acquisizione dello zinco (ZnuABC), che è sovra-regolato in condizioni di limitazione dello Zn, e il ceppo mutante *znuB* sperimenta la fame di Zn a concentrazioni di Zn più elevate rispetto al wild-type (Hood et al., 2012). ZnuB contribuisce alla patogenesi delle infezioni polmonari *da A. baumannii*. In particolare, la limitazione dello zinco riduce la MIC dell'imipenem di *A. baumannii* MDR al di sotto del breakpoint clinico per la resistenza all'imipenem in *A. baumannii* (Hood et al., 2012), probabilmente perché molte carbapenemasi sono metalloenzimi che richiedono Zn per la loro attività idrolizzante. Oltre al sistema ZnuABC, in *A. baumannii* è stato caratterizzato il nuovo metallochaperone Zn ZigA (Nairn et al., 2016). ZigA interagisce strettamente con lo Zn, il che è necessario per la crescita batterica in condizioni di fame di Zn e per l'infezione disseminata nei topi (Nairn et al., 2016).

È stato identificato il meccanismo utilizzato da *A. baumannii* per superare la limitazione di Mn. La calprotectina induce la fame di Mn in *A. baumannii*, che aumenta la trascrizione di un trasportatore di Mn della famiglia NRAMP (Natural Resistance-

Associated Macrophage Proteins) e di un'urea carbossilasi per resistere alle attività antimicrobiche della calprotectina (Juttukonda et al., 2016). Un enzima urea carbossilasi (MumC) è importante per la crescita di *A. baumannii* in presenza di calprotectina e un trasportatore della famiglia NRAMP (MumT) contribuisce alla fitness di *A. baumannii* in un modello di polmonite murina (Juttukonda et al., 2016), il ceh suggerisce che le due proteine sono fattori di virulenza. *Acinetobacter baumannii* può utilizzare l'urea come unica fonte di azoto e questo utilizzo dell'urea è necessario per MumC (Juttukonda et al., 2016). Sulla base del contributo di MumC alla resistenza di *A. baumannii* alla calprotectina, gli autori suggeriscono un collegamento tra la fame di metalli e lo stress metabolico, ad esempio la fame di azoto.

8.2.6 SISTEMI DI SECREZIONE PROTEICA

In A. baumannii sono stati identificati diversi sistemi di secrezione proteica (Weber et al., 2015a). Il sistema di secrezione di *A. baumannii* descritto più di recente è un sistema di secrezione di tipo II (T2SS) (Johnson et al., 2015). Il T2SS è un complesso multiproteico strutturalmente molto simile ai sistemi pili di tipo IV, un'appendice comunemente presente nei batteri Gram-negativi (Korotkov et al., 2012). Il T2SS trasloca un'ampia gamma di proteine dallo spazio periplasmatico al milieu extracellulare fuori dalla cellula o dalla superficie della membrana esterna. Il T2SS è composta da 12-15 proteine che comprendono quattro sottoinsiemi: uno pseudopilo, una ATPasi di secrezione citoplasmatica, un insieme di piattaforme della membrana interna e un complesso dodecamerale della membrana esterna (Korotkov et al., 2012; Harding et al., 2016). La secrezione da parte di T2SS è un processo a due fasi. Le proteine bersaglio vengono prima traslocate nel periplasma dal sistema secretorio generale (Sec) o dal sistema di trasporto gemellare dell'arginina (Tat), dove vengono poi secrete dalla cellula attraverso il T2SS (Korotkov et al., 2012). L'eliminazione dei geni di *A. baumannii* per i componenti del T2SS, *gspD* o *gspE*, determina la perdita della secrezione di

LipA, indicando che LipA è un substrato del T2SS (Johnson et al., 2015). Poiché LipA è una lipasi che scinde gli acidi grassi a catena lunga, i ceppi mutanti di *LipA, gspD* e *gspE* non sono in grado di crescere con acidi grassi a catena lunga come unica fonte di carbonio e sono difettosi nella crescita *in vivo* in un modello murino neutropenico di batteriemia (Johnson et al., 2015). Il ruolo di un T2SS funzionale per la piena virulenza di *A. baumannii* è stato dimostrato in modelli di infezione polmonare di *G. mellonella* e murini (Harding et al., 2016). Le lipasi (LipA, LipH e LipAN) e la metallopeptidasi CpaA sono state identificate come substrati di T2SS (Elhosseiny et al., 2016; Harding et al., 2016). In particolare, due proteine (LipA e CpaA) tra queste proteine secrete richiedono chaperoni specifici per la secrezione. Questi chaperoni sono codificati accanto al loro effettore cognato e la loro inattivazione abolisce la secrezione di LipA e CpaA (Harding et al., 2016).

Anche *Acinetobacter baumannii* possiede un sistema di secrezione di tipo VI (T6SS). T6SS è stato identificato per la prima volta in *Vibrio cholera* e *P. aeruginosa* (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Molti batteri utilizzano T6SS per iniettare proteine effettrici, fornendo un vantaggio nella colonizzazione durante l'infezione di ospiti eucarioti (Mougous et al., 2006) o per uccidere batteri concorrenti (Basler et al., 2013). T6SS porta al rilascio di DNA e al trasferimento genico orizzontale in *V. cholera*, che può contribuire alla diffusione della resistenza agli antibiotici (Borgeaud et al., 2015). Il T6SS è composto da varie proteine strutturali e fattori accessori conservati e presenta una struttura in grado di contrarsi, simile a una guaina batteriofaga che assume una forma ad ago o a spiga, utile per penetrare nella cellula bersaglio (Shneider et al., 2013). L'Hcp è una proteina strutturale che forma una rete tubolare polimerizzata che viene secreta dalla cellula, mentre le VgrG sono coinvolte nel fissaggio dei domini effettori alla spike; una proteina ripetuta prolina-alanina-arginina (PAAR) forma una punta affilata della caratteristica forma ad aghi (Shneider et al., 2013; Zoued et al., 2014).

La presenza di T6SS in *A. baumannii* è stata inizialmente prevista dall'analisi bioinformatica (Weber et al., 2013). Sebbene il ruolo di T6SS in *A. baumannii* ATCC 17978 non sia stato determinato (Weber et al., 2013), una ricerca sul ceppo M2 di *A. baumannii* ha dimostrato che questo ceppo produce T6SS funzionale e che la T6SS media l'uccisione dei batteri concorrenti (Carruthers et al., 2013). Un altro studio ha dimostrato che T6SS è attivo in sei ceppi patogeni di *A. baumannii* (Ruiz et al., 2015). Tuttavia, T6SS sembra svolgere un ruolo importante nella virulenza *di A. baumannii* in modo specifico per il ceppo (Repizo et al., 2015). Hanno confrontato la funzionalità di T6SS di diversi ceppi di *A. baumannii*, tra cui ATCC17978 (un ceppo tipo), vari ceppi MDR implicati in focolai ospedalieri (Ab242, Ab244 e Ab825) e DSM30011 (un isolato non clinico). Sebbene il locus genomico T6SS sia presente in tutti questi ceppi, solo DSM30011 ha un T6SS completamente attivo che media l'uccisione di *E. coli* (Repizo et al., 2015). Inoltre, il T6SS di DSM30011 è necessario per la colonizzazione dell'ospite dell'organismo modello *G. mellonella* (Repizo et al., 2015). Sono stati ottenuti dei risultati simili da un'analisi comparativa dei genomi di ceppi clinici MDR di *A. baumannii* (Wright et al., 2014; Jones et al., 2015). Gli isolati di *A. baumannii* di un particolare clade presentano una perdita completa del locus genomico T6SS. Pertanto, questi risultati suggeriscono che sono necessarie indagini più approfondite per analizzare il ruolo di T6SS nella virulenza *di A. baumannii*, anche se questo sistema sembra svolgere un ruolo importante nella virulenza *di A. baumannii* in alcuni ceppi. In particolare, uno studio ha dimostrato che diversi ceppi MDR *di A. baumannii* hanno un plasmide di grandi dimensioni, autotrasmissibile, che trasporta regolatori negativi per T6SS (Weber et al., 2015b). T6SS è silenziato nelle cellule contenenti il plasmide e resistenti agli antibiotici, mentre le cellule che perdono il plasmide hanno un T6SS attivo. Sebbene le cellule che perdono il plasmide siano in grado di uccidere i batteri concorrenti mediati da T6SS, diventano sensibili agli antibiotici (Weber et al.,

2015b). Questo risultato suggerisce un interruttore molecolare tra T6SS e resistenza agli antibiotici.

Anche l'autotrasportatore del sistema di tipo V Ata è stato caratterizzato in *A. baumannii* (Bentancor et al., 2012a). Si tratta di una proteina di membrana trimerica che media la formazione di biofilm, l'adesione a componenti della matrice extracellulare come il collagene I, III e IV e la virulenza in un modello sistemico murino di infezione *da Acinetobacter* (Bentancor et al., 2012a). Un altro esperimento che ha utilizzato un modello di infezione da polmonite in topi immunocompetenti e immunocompromessi ha dimostrato che Ata è un candidato al vaccino contro le infezioni *da A. baumannii* (Bentancor et al., 2012b). Un sistema di secrezione di tipo IV presente nel plasmide è stato identificato tramite bioinformatica in *A. baumannii* (Liu C. C. et al., 2014), ma non sono state presentate prove sperimentali che ne descrivano la funzione.

8.2.7 PROTEINA CHE LEGA LA PENICILLINA 7/8 (PBP7/8) E β-LATTAMASI PER-1

Sebbene le PBP siano comunemente coinvolte nella resistenza agli antibiotici β-lattamici, la PBP7/8 codificata dal gene *pbp*G è un fattore di virulenza in *A. baumannii*. Il ceppo mutante *pbp*G cresce in modo simile al ceppo wild-type in terreno Luria-Bertani, ma il mutante mostra una crescita ridotta nel siero umano e la sua sopravvivenza diminuisce significativamente nei modelli di infezione dei tessuti molli e di polmonite dei ratti (Russo et al., 2009). Un'indagine sulla morfologia batterica mediante microscopia elettronica ha suggerito che la perdita di PBP7/8 può aver influenzato la struttura del peptidoglicano, che può influire sulla suscettibilità ai fattori di difesa dell'ospite (Russo et al., 2009).

È interessante notare che la β-lattamasi PER-1 è stata suggerita come fattore di virulenza *di A. baumannii*. PER-1 è una β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), ma questo gene è associato all'adesione cellulare (Sechi et al., 2004). Nove ceppi produttori di PER-1 aderiscono alle linee cellulari Caco2, mentre tutti i

ceppi PER-1-negativi sono negativi all'adesione cellulare (Sechi et al., 2004). In particolare, molte β-lattamasi sono associate alla virulenza in vari batteri patogeni, come *E. coli* (Dubois et al., 2009), *P. aeruginosa* (Moya et al., 2008) e *K. pneumoniae* (Sahly et al., 2008). Tuttavia, non sono stati proposti dei meccanismi generalmente validi (Beceiro et al., 2013).

8.2.8 ALTRI

La CipA di *Acinetobacter baumannii* è una nuova proteina che lega il plasminogeno e inibisce il complemento, mediando la resistenza al siero (Koenigs et al., 2016). Il plasminogeno legato a CipA viene convertito in plasmina attiva che degrada il fibrinogeno e il complemento C3b, contribuendo alla resistenza al siero di *A. baumannii*. Di conseguenza il ceppo mutante *CipA* viene ucciso efficacemente dal siero umano e mostra anche un difetto nella penetrazione dei monostrati endoteliali (Koenigs et al., 2016). Come CipA, anche il fattore di allungamento della traduzione di *A. baumannii*, Tuf, è una proteina che lega il plasminogeno. Il plasminogeno legato a Tuf può essere convertito in plasmina attiva, che degrada proteoliticamente il fibrinogeno e il componente C3b (Koenigs et al., 2015). RecA, coinvolto nella ricombinazione omologa e nella risposta SOS, è stato identificato come un fattore di virulenza *di A. baumannii*. Il mutante *recA* mostra una sopravvivenza significativamente ridotta all'interno dei macrofagi e diminuisce la letalità in un modello murino di infezione sistemica (Aranda et al., 2011). La proteina 1 dell'antigene di superficie (SurA1) svolge un ruolo importante nella fitness e nella virulenza di *A. baumannii* (Liu D. et al., 2016). La resistenza al siero del mutante *surA1* diminuisce significativamente rispetto a quella del ceppo wild-type CCGGD201101. Nel modello di insetto *G. mellonella*, un ceppo mutante *surA1* mostra un tasso di sopravvivenza inferiore e una minore diffusione (Liu D. et al., 2016).

Un'analisi della crescita di 250.000 mutanti del trasposone di *A. baumannii* all'interno di larve di *G. mellonella* ha identifi-

cato 300 geni necessari per la sopravvivenza o la crescita di *A. baumannii* all'interno delle larve di *G. mellonella* (Gebhardt et al., 2015). I 300 geni sono stati classificati in sei categorie: acquisizione di micronutrienti, metabolismo della cisteina/assimilazione dello zolfo, metabolismo degli idrocarburi aromatici, involucro/membrana/parete cellulare, geni di risposta allo stress, resistenza agli antibiotici e regolazione trascrizionale. Tra questi, quattro regolatori trascrizionali necessari per la crescita nelle larve di *G. mellonella* sono stati chiamati geni *gig* (growth in *Galleria*). La perdita di questi geni (*gigA-D*) ha portato a una carenza significativa sia nella crescita che nell'uccisione delle larve di *G. mellonella* (Gebhardt et al., 2015). Questo studio ha identificato le proteine dello stress, ad esempio UspA, come fattori necessari per la crescita in *G. mellonella*. Un altro studio ha dimostrato che UspA è essenziale per la patogenesi della polmonite e della sepsi di *A. baumannii* (Elhosseiny et al., 2015). Tra i 300 geni, diversi sono coinvolti nel metabolismo degli idrocarburi aromatici (Gebhardt et al., 2015). Un altro studio ha dimostrato che GacS, che è un fattore trascrizionale che regola l'espressione di geni, come *paaE*, ed è responsabile della via catabolica dell'acido fenilacetico, influenza la virulenza di *A. baumannii* (Cerqueira et al., 2014). Gli esperimenti condotti utilizzando un mutante con delezione di *paaE* hanno confermato il ruolo del metabolismo degli idrocarburi aromatici nella virulenza *di A. baumannii* (Cerqueira et al., 2014), ma il suo meccanismo molecolare rimane sconosciuto. Un recente report, molto interessante, ha dimostrato che l'accumulo di fenilacetato in *A. baumannii* induce un rapido afflusso di neutrofili in un sito localizzato di infezione e aumenta la clearance batterica (Bhuiyan et al., 2016). Qui si suggerisce che il fenilacetato è un chemioattrattore dei neutrofili che induce una chemiotassi neutrofila guidata dai batteri. Questa relazione potrebbe rivelare un nuovo meccanismo molecolare sul ruolo della via catabolica dell'acido fenilacetico nella virulenza di *A. baumannii*.

La formazione di biofilm svolge un ruolo importante nell'evasione immunitaria da parte di *A. baumannii* (de Breij et al., 2010) e i pili sono essenziali per l'adesione e la formazione di

biofilm su superfici abiotiche e per la virulenza di *A. baumannii* (Tomaras et al., 2003, 2008). In particolare, il trattamento con imipenem dell'isolato di *A. baumannii* resistente all'imipenem induce l'espressione di importanti geni responsabili della sintesi dei pili di tipo IV (Dhabaan et al., 2015), e ciò suggerisce che la capacità di sovrapprodurre pili conferisca un vantaggio biologico ad *A. baumannii*.

Sono state identificate altre proteine legate alla virulenza, tra cui OmpR/EnvZ (Tipton e Rather, 2016), FhaBC (Perez et al., 2016) e il trasportatore di membrana di tipo resistenza-nodulazione-divisione AbeD (Srinivasan et al., 2015), ma i loro meccanismi molecolari rimangono sconosciuti.

8.3 RESISTENZA ANTIMICROBICA DI *A. BAUMANNII*

L'Acinetobacter baumannii è diventato uno dei patogeni di maggior successo nell'assistenza sanitaria moderna grazie alla sua sorprendente capacità di acquisire resistenza antimicrobica. Diversi ceppi di *A. baumannii* sono altamente resistenti alla maggior parte degli antibiotici clinicamente disponibili (Lin e Lan, 2014). L'*A. baumannii* possiede una serie di meccanismi di resistenza, tra cui β-lattamasi, enzimi che modificano gli aminoglicosidi, pompe di efflusso, difetti di permeabilità e modifiche dei siti bersaglio. L'accumulo di diversi meccanismi di resistenza in *A. baumannii* ha gradualmente ridotto il numero di classi di antibiotici disponibili per il trattamento delle infezioni da *A. baumannii* nella pratica clinica. La Tabella 2 mostra i meccanismi di resistenza agli antibiotici riscontrati in *A. baumannii*. Di seguito ne discutiamo i dettagli.

Resistance mechanism	Class/subgroup	Protein	References
β-Lactamases	Class A	TEM-1	Chen et al., 2006; Adams et al., 2008; Krizova et al., 2013
		TEM-92	Endimiani et al., 2007
		GES-1	Al-Agamy et al., 2016
		GES-5	Al-Agamy et al., 2016
		GES-11	Moubareck et al., 2009; Bogaerts et al., 2010; Chihi et al., 2016
		GES-12	Bogaerts et al., 2010
		GES-14	Bogaerts et al., 2010
		PER-1	Jeong et al., 2005; Poirel et al., 2005a; Aly et al., 2016
		PER-2	Pasteran et al., 2006
		PER-7	Bonnin et al., 2011b
		CTX-M-2	Nagano et al., 2004
		CTX-M-15	Potron et al., 2011
		SCO-1	Poirel et al., 2007
		VEB-1	Fournier et al., 2006; Naas et al., 2006; Pasteran et al., 2006; Adams et al., 2008; Poirel et al., 2009
		KPC-2	Martinez et al., 2016
		KPC-10	Robledo et al., 2010
		CARB-4	Ramirez et al., 2010b
		CARB-10	Potron et al., 2009
	Class B	IMP-1	Tognim et al., 2006
		IMP-2	Riccio et al., 2000
		IMP-4	Chu et al., 2001
		IMP-5	Koh et al., 2007
		IMP-6	Gales et al., 2003
		IMP-8	Lee M. F. et al., 2008
		IMP-11	Yamamoto et al., 2011
		IMP-19	Yamamoto et al., 2011
		IMP-24	Lee M. F. et al., 2008
		VIM-1	Tsakris et al., 2006, 2008; Papa et al., 2009
		VIM-2	Yum et al., 2002; Lee M. F. et al., 2008
		VIM-3	Lee M. F. et al., 2008
		VIM-4	Tsakris et al., 2008; Papa et al., 2009
		VIM-11	Lee M. F. et al., 2008
		NDM-1	Chen et al., 2011; Pfeifer et al., 2011; Bonnin et al., 2012; Voulgari et al., 2016
		NDM-2	Espinal et al., 2011
		NDM-3	Kumar, 2016
		SIM-1	Lee et al., 2005
	Class C	AmpC	Bou and Martinez-Beltran, 2000; Corvec et al., 2003; Segal et al., 2004; Hujer et al., 2005; Heritier et al., 2006; Liu and Liu, 2015
	Class D		
	OXA-2 subgroup	OXA-21	Vila et al., 1997
	OXA-10 subgroup	OXA-128	Giannouli et al., 2009
	OXA-20 subgroup	OXA-37	Navia et al., 2002
	OXA-23 subgroup	OXA-23	Heritier et al., 2005b; Naas et al., 2005; Corvec et al., 2007; Koh et al., 2007; Perez et al., 2007; Valenzuela et al., 2007; Wang et al., 2007; Adams et al., 2008; Stoeva et al., 2008; Kohlenberg et al., 2009; Kuo et al., 2010; Mugnier et al., 2010; Bonnin et al., 2011a; Lee et al., 2011; Lin et al., 2011b; Koh et al., 2012; Mosqueda et al., 2013; Chagas et al., 2014; Principe et al., 2014; Li Y. et al., 2015
		OXA-133	Mendes et al., 2009
		OXA-239	Gonzalez-Villoria et al., 2016
	OXA-24 subgroup	OXA-24	Bou et al., 2000b; Merino et al., 2010; Acosta et al., 2011; Pailhories et al., 2016
		OXA-25, OXA-26, OXA-27	Afzal-Shah et al., 2001
		OXA-40	Heritier et al., 2003; Lolans et al., 2006; Quinteira et al., 2007; Ruiz et al., 2007

		OXA-72	Wang et al., 2007; Lu et al., 2009; Goic-Barisic et al., 2011; Dortet et al., 2016; Kuo et al., 2016
		OXA-143	Higgins et al., 2009
		OXA-182	Kim et al., 2010
	OXA-51 subgroup	OXA-51	Brown et al., 2005; Hu et al., 2007; Ruiz et al., 2007; Adams et al., 2008; Chen et al., 2010; Fang et al., 2016
		OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-70, OXA-71	Hamouda et al., 2010; Biglari et al., 2016
		OXA-69, OXA-75, OXA-76, OXA-77	Heritier et al., 2005a
		OXA-79, OXA-80, OXA-104, OXA-106~ OXA-112	Evans et al., 2007
		OXA-82, OXA-83, OXA-83, OXA-84	Turton et al., 2006b; Evans et al., 2007
		OXA-86, OXA-87	Vahaboglu et al., 2006
		OXA-88, OXA-91, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-96	Koh et al., 2007
		OXA-92	Tsakris et al., 2007
		OXA-113	Naas et al., 2007
	OXA-58 subgroup	OXA-58	Dijkshoorn et al., 1996; Poirel et al., 2005b; Pournaras et al., 2006; Chen et al., 2008; Qi et al., 2008; Donnarumma et al., 2010; Gogou et al., 2011; Ravasi et al., 2011; Hou and Yang, 2015
		OXA-96	Koh et al., 2007
		OXA-97	Poirel et al., 2008
	OXA-143 subgroup	OXA-253	de Sa Cavalcanti et al., 2016
	OXA-235 subgroup	OXA-235	Higgins et al., 2013
Efflux pumps	Resistance-nodulation-division superfamily	AdeABC	Magnet et al., 2001; Marchand et al., 2004; Peleg et al., 2007; Ruzin et al., 2007; Lin et al., 2015; Sun et al., 2016
		AdeFGH	Coyne et al., 2010; He X. et al., 2015
		AdeIJK	Damier-Piolle et al., 2008
	Major facilitator superfamily	TetA	Ribera et al., 2003a
		TetB	Vilacoba et al., 2013
		CmlA	Coyne et al., 2011
		CraA	Roca et al., 2009
		AmvA	Rajamohan et al., 2010
		AbeF	Sharma et al., 2016
	Multidrug and toxic compound extrusion family	AbeM	Su et al., 2005
	Small multidrug resistance family	AbeS	Srinivasan et al., 2009
	Other efflux pumps	EmrAB-TolC	Nowak-Zaleska et al., 2016
		A1S_1535, A1S_2795, and ABAYE_0913	Li L. et al., 2016
Permeability defects	Porin	OmpA	Smani et al., 2014; Wu et al., 2016
		CarO	Mussi et al., 2005, 2007; Siroy et al., 2005; Catel-Ferreira et al., 2011; Jin et al., 2011
		Omp22-33	Bou et al., 2000a
		Omp33-36	del Mar Tomas et al., 2005
		Omp37	Quale et al., 2003
		Omp43	Dupont et al., 2005
		Omp44	Quale et al., 2003
		Omp47	Quale et al., 2003
Aminoglycoside-modifying enzymes	Aminoglycoside acetyltransferases	AAC3 (*aacC1*, *aacC2*)	Nemec et al., 2004
		AAC(6′) (*aacA4*)	Doi et al., 2004; Cho et al., 2009; Zhu et al., 2009; Lin et al., 2010; Lin M. F. et al., 2013; Bakour et al., 2014
	Aminoglycoside adenyltransferases	ANT(2″) (*aadB*)	Nemec et al., 2004
		ANT(3″) (*aadA1*)	Cho et al., 2009; Lin et al., 2010; Lin M. F. et al., 2013
	Aminoglycoside phosphotransferases	APH(3′) (*aphA1*)	Gallego and Towner, 2001
		APH(3″)	Cho et al., 2009

Aminoglycoside-modifying enzymes	Aminoglycoside acetyltransferases	AAC3 (*aacC1*, *aacC2*)	Nemec et al., 2004
		AAC(6′) (*aacA4*)	Doi et al., 2004; Cho et al., 2009; Zhu et al., 2009; Lin et al., 2010; Lin M. F. et al., 2013; Bakour et al., 2014
	Aminoglycoside adenyltransferases	ANT(2″) (*aadB*)	Nemec et al., 2004
		ANT(3″) (*aadA1*)	Cho et al., 2009; Lin et al., 2010; Lin M. F. et al., 2013
	Aminoglycoside phosphotransferases	APH(3′) (*aphA1*)	Gallego and Towner, 2001
		APH(3″)	Cho et al., 2009
Alteration of target sites	Change of penicillin binding protein(PBP)	PBP2	Gehrlein et al., 1991
	16S rRNA methylation	ArmA	Yu et al., 2007; Cho et al., 2009; Karthikeyan et al., 2010; Brigante et al., 2012; Hong et al., 2013; Bakour et al., 2014; Tada et al., 2014
	Ribosomal protection	TetM	Ribera et al., 2003b
	DNA gyrase	GyrA/ParC	Higgins et al., 2004
	Dihydrofolate reductase	DHFR	Mak et al., 2009; Lin M. F. et al., 2013
		FolA	Mak et al., 2009
	Lipopolysaccharide	PmrC, LpxA, LpxC, LpxD	Adams et al., 2009; Moffatt et al., 2010; Arroyo et al., 2011
Other mechanisms	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	Trm	Chen et al., 2014; Trebosc et al., 2016
	1-Acyl-sn-3-phosphate acyltransferase	PlsC	Li X. et al., 2015
	Peptidase C13 family	Abrp	Li X. et al., 2016
	Cell division proteins	BlhA, ZipA, ZapA, and FtsK	Knight et al., 2016
	SOS response	RecA	Aranda et al., 2011, 2014; Norton et al., 2013

TABELLA 2. *Meccanismi di resistenza in Acinetobacter baumannii*

8.3.1 β-LATTAMASI

L'inattivazione dei β-lattami da parte delle β-lattamasi è uno dei principali meccanismi di resistenza agli antibiotici in *A. baumannii*. Sulla base dell'omologia di sequenza, le β-lattamasi sono raggruppate in classi molecolari, A, B, C e D (Jeon et al., 2015). In A. baumannii sono state identificate tutte e quattro le classi di β-lattamasi. Degli studi recenti hanno dimostrato che *A. baumannii* è naturalmente in grado di incorporare DNA esogeno e il suo genoma presenta DNA estraneo ad alta frequenza, il che implica un frequente trasferimento genico orizzontale in questo patogeno (Ramirez et al., 2010a; Touchon et al., 2014; Traglia et al., 2014). Inoltre, l'albumina, una delle principali proteine del sangue, aumenta questa competenza naturale di *A. baumannii* (Traglia et al., 2016). Pertanto, la competenza naturale di *A. baumannii* può contribuire all'identificazione di diverse β-lattamasi in questo pericoloso patogeno umano.

Le β-lattamasi di classe A inibite dal clavulanato idrolizzano le penicilline e le cefalosporine in modo più efficiente dei carbapenemi, ad eccezione di alcuni enzimi di tipo KPC (Jeon et al., 2015). In *A. baumannii* sono state identificate numerose β-lattamasi di classe A, tra cui TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC e CARB (Tabella 2). Alcuni di questi enzimi, come TEM-1, CARB-4 e SCO-1, sono β-lattamasi a spettro ristretto, mentre altri enzimi (ad esempio, PER-1, TEM-92, CARB-10, SHV-5, PER-2, CTX-M-2, CTX-M-15, VEB-1, GES-14 e PER-7) sono ESBL. Alcune carbapenemasi, come GES-14 e KPC-2, sono state individuate in *A. baumannii* (Moubareck et al., 2009; Bogaerts et al., 2010).

A differenza delle β-lattamasi serina-dipendenti (classi A, C e D), le β-lattamasi di classe B sono metallo-β-lattamasi (MBL) e richiedono zinco o un altro metallo pesante per la catalisi (Jeon et al., 2015). Grazie all'ampio spettro di substrati, le MBL catalizzano l'idrolisi di quasi tutti gli antibiotici β-lattamici, compresi i carbapenemi, ma non i monobattami (Jeon et al., 2015). In *A. baumannii* sono state identificate diverse β-lattamasi di classe B (Tabella 2).

Le β-lattamasi di classe C pongono problemi terapeutici perché possono conferire resistenza alle cefamicine (cefoxitina e cefotetan), alle penicilline, alle cefalosporine e alle combinazioni di inibitori delle β-lattamasi, ma non sono inibite in modo significativo dagli inibitori delle β-lattamasi usati clinicamente, come l'acido clavulanico (Jeon et al., 2015). *Acinetobacter baumannii* possiede una cefalosporinasi AmpC intrinseca (Gordon e Wareham, 2010). Un'analisi di 23 isolati clinici MDR di *A. baumannii* a Taiwan ha mostrato che tutti gli isolati avevano β-lattamasi di tipo AmpC (Lin et al., 2011a). Diversi isolati clinici di *A. baumannii* presentano il gene *amp*C trascritto da un forte promotore contenuto in un elemento di sequenza di inserzione putativa (sequenza simile a *ISAba1*), che determina un'elevata resistenza alla ceftazidima (Corvec et al., 2003; Segal et al., 2004). Questa sequenza è stata identificata in isolati di *A. baumannii* resistenti

alla ceftazidima, ma è assente in isolati di *A. baumannii* sensibili alla ceftazidima (Heritier et al., 2006).

Le β-lattamasi di classe D sono chiamate OXA (oxacillinasi), perché comunemente idrolizzano l'isossazolilpenicillina oxacillina molto più velocemente della benzilpenicillina (Jeon et al., 2015). Sono stati identificati più di 400 enzimi di tipo OXA e molte varianti possiedono effettivamente un'attività carbapenemica. In *A. baumannii* la presenza di β-lattamasi di classe D che idrolizzano i carbapenemi o MBL è uno dei principali meccanismi di resistenza ai carbapenemi (Lin e Lan, 2014). In *A. baumannii* sono inoltre prevalenti i sottogruppi di OXA che idrolizzano i carbapenemi, come i sottogruppi OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58 (Tabella 2). L'enzima OXA-23 è stato identificato per la prima volta in un isolato di *A. baumannii* nel Regno Unito nel 1985 (Perez et al., 2007). Il gene *blaOXA-23 si* è diffuso in tutto il mondo e i ceppi di *A. baumannii* produttori di OXA-23 sono frequenti in modo significativo (Mugnier et al., 2010; Al-Agamy et al., 2016). Un recente report proveniente dal Libano ha mostrato che il 76,5% di 119 isolati *di A. baumannii* è resistente ai carbapenemi e le β-lattamasi OXA-23 sono state trovate in 82 isolati (Al Atrouni et al., 2016). È stato riportato che l'inserzione di *ISAba1* nella sequenza promotrice di *blaOXA-23 è* associata alla sovraespressione di *blaOXA-23*, *blaOXA-51* o *blaOXA-58* in *A. baumannii* (Turton et al., 2006a). Un report proveniente dall'India ha mostrato che *blaOXA-51* e *blaOXA-23* erano presenti in tutti i 103 isolati di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi e quasi l'80% degli isolati presentava *ISAba1* a monte del gene *blaOXA-23*, il che indica la prevalenza dell'inserzione *ISAba1* (Vijayakumar et al., 2016).

8.3.2 POMPE DI EFFLUSSO

Le pompe di efflusso sono associate alla resistenza a diverse classi di antibiotici, come l'imipenem (Hu et al., 2007) e la tigeciclina (Peleg et al., 2007; Ruzin et al., 2007), in *A. baumannii*. L'inversione della resistenza agli antibiotici da parte di inibitori

della pompa di efflusso, come la 1-(1-naftilmetil)-piperazina e il cianuro di carbonile 3-clorofenil-idrazone, supporta l'importanza delle pompe di efflusso nella resistenza agli antibiotici *di A. baumannii* (Pannek et al., 2006; Deng et al., 2014). Quattro categorie di pompe di efflusso, come la superfamiglia della resistenza-nodulazione-divisione, la famiglia dell'estrusione di composti tossici e multifarmaci, la superfamiglia del facilitatore maggiore e la famiglia dei piccoli trasportatori della resistenza ai farmaci, sono correlate alla resistenza antimicrobica in *A. baumannii* (Tabella 2; Lin e Lan, 2014).

AdeABC, nella superfamiglia della resistenza-nodulazione-divisione, è associato alla resistenza agli aminoglicosidi (Magnet et al., 2001) e alla diminuzione della suscettibilità alla tigeciclina (Ruzin et al., 2007) e agli antibiotici non-fluorochinolonici (Higgins et al., 2004). AdeABC sembra essere criptico in *A. baumannii* wild-type a causa dello stretto controllo da parte del sistema bicomponente AdeRS (Marchand et al., 2004), ma delle mutazioni puntiformi o l'inserimento della sequenza *ISAba1* nel gene *adeS* portano alla sovraespressione di AdeABC (Marchand et al., 2004; Sun et al., 2012, 2016; Hammerstrom et al., 2015). Anche la densità cellulare (Fernando e Kumar, 2012) e il sistema bicomponente BaeSR (Lin et al., 2014, 2015), coinvolto in una risposta allo stress da involucro, sembrano regolare la trascrizione del gene *adeA* e quindi influenzare la suscettibilità alla tigeciclina. Altre pompe di efflusso di tipo resistenza-nodulazione-divisione, come AdeFGH e AdeIJK, sono associate sinergicamente alla resistenza alla tigeciclina (Damier-Piolle et al., 2008). L'espressione di AdeFGH e AdeIJK è regolata dal regolatore trascrizionale di tipo LysR AdeL e dal regolatore trascrizionale di tipo TetR AdeN (Coyne et al., 2010; Rosenfeld et al., 2012).

Gli isolati clinici di *Acinetobacter baumannii* possiedono una forte capacità di formare biofilm (Rodriguez-Bano et al., 2008). In particolare, le concentrazioni subinibitorie di antibiotici riscontrate nella terapia a basso dosaggio sembrano indurre fortemente la formazione di biofilm (Kaplan, 2011). C'è una recente scoperta che ha rivelato il meccanismo. La sovraespressione della

pompa di efflusso AdeFGH da parte della terapia antimicrobica a basso dosaggio aumenta la sintesi e il trasporto di molecole autoinduttrici, che inducono la formazione di biofilm (He X. et al., 2015). Questi risultati suggeriscono un legame tra la terapia antimicrobica a basso dosaggio e un rischio elevato di infezioni da biofilm causate da *A. baumannii*.

CmlA e CraA sono pompe di efflusso della superfamiglia dei facilitatori correlate al cloramfenicolo (Fournier et al., 2006; Roca et al., 2009), mentre TetA si associa alla resistenza alla tetraciclina (Ribera et al., 2003a). La nuova pompa di efflusso AmvA media la resistenza a diverse classi di antibiotici, disinfettanti, detergenti e coloranti, come eritromicina, acriflavina, cloruro di benzalconio e metile viologen (Rajamohan et al., 2010). AbaF è stata recentemente identificata come una nuova pompa di efflusso associata alla resistenza alla fosfomicina (Sharma et al., 2016).

AbeM fa parte della famiglia di estrusione di composti multifarmaco e tossici e conferisce resistenza a imipenem e fluorochinoloni (Su et al., 2005). AbeS è un piccolo trasportatore della famiglia della resistenza ai farmaci e influisce sulla resistenza a vari composti antimicrobici. La delezione del gene *abeS* determina un aumento della suscettibilità a vari composti antimicrobici, come il cloramfenicolo, l'acido nalidixico e l'eritromicina (Srinivasan et al., 2009).

Alcune altre pompe di efflusso, come MacAB-TolC (Kobayashi et al., 2001) ed EmrAB-TolC (Lomovskaya e Lewis, 1992), sono state ben descritte in *E. coli*, ma il loro ruolo in *A. baumannii* è stato indagato solo di recente. La pompa di efflusso EmrAB-TolC è presente anche in *A. baumannii*, dove ha conferito resistenza a netilmicina, tobramicina e imipenem (Nowak-Zaleska et al., 2016). Un altro rapporto ha identificato tre nuove pompe di efflusso (A1S_1535, A1S_2795 e ABAYE_0913) in *A. baumannii* utilizzando uno screening fenotipico multiplex (Li L. et al., 2016). A1S_1535 conferisce resistenza a diversi antibiotici, tra cui gentamicina, kanamicina, cloroxilenolo, ossitetraciclina, 1,10-fenantrolina e cloramfenicolo (Li L. et al., 2016). A1S_2795 è la prima pompa di efflusso della superfamiglia dei facilitatori

principali a conferire resistenza al sulfamidico sulfatiazolo, mentre ABAYE_0913 è associata alla resistenza al cloramfenicolo e all'acido fusidico (Li L. et al., 2016).

8.3.3 DIFETTI DI PERMEABILITÀ

Un cambiamento nella permeabilità dell'involucro può influenzare la resistenza agli antibiotici. Ad esempio, le porine formano canali che consentono il trasporto di molecole attraverso la membrana esterna e svolgono un ruolo significativo nella virulenza *di A. baumannii* (Tabella 1).

Poiché le porine influenzano la permeabilità della membrana, svolgono un ruolo significativo nel meccanismo della resistenza. La ridotta espressione di alcune porine, tra cui CarO (Mussi et al., 2005, 2007; Siroy et al., 2005; Catel-Ferreira et al., 2011; Jin et al., 2011), Omp22-33 (Bou et al., 2000a), Omp33-36 (del Mar Tomas et al., 2005; Hood et al., 2010), Omp37 (Quale et al., 2003), Omp43 (Dupont et al., 2005), Omp44 (Quale et al., 2003) e Omp47 (Quale et al., 2003), è associata alla resistenza ai carbapenemi in *A. baumannii*.

La perdita di Omp29 in *A. baumannii* che produce carbapenemasi simili a OXA-51 o OXA-23 determina un aumento della resistenza all'imipenem (Jeong et al., 2009; Fonseca et al., 2013). L'OmpA è anche correlata alla resistenza ad aztreonam, cloramfenicolo e acido nalidixico (Smani et al., 2014). Uno studio ha dimostrato che OmpA e CarO interagiscono fisicamente con la carbapenemasi OXA-23 e queste interazioni sono associate alla resistenza agli antibiotici (Wu et al., 2016). Questi risultati forniscono un nuovo punto di vista per aumentare la comprensione dei meccanismi di resistenza batterica agli antibiotici.

Oltre alle proteine della membrana esterna, anche i componenti dell'involucro, come LPS e peptidoglicani, influiscono sulla resistenza agli antibiotici di *A. baumannii*. La perdita o la modifica dell'LPS riduce l'integrità della membrana e aumenta la resistenza alla colistina in *A. baumannii* (Adams et al., 2009; Moffatt et al., 2010).

8.3.4 ENZIMI MODIFICATORI DI AMINOGLICOSIDI

Gli enzimi che modificano gli aminoglicosidi sono il meccanismo principale con cui *A. baumannii* conferisce resistenza agli aminoglicosidi. Gli enzimi modificanti gli aminoglicosidi possono essere classificati in acetiltransferasi, adeniltransferasi e fosfotransferasi. Questi enzimi sono tipicamente presenti su elementi trasponibili e vengono trasferiti tra batteri patogeni (Lin e Lan, 2014). Diversi rapporti mostrano che molti isolati di *A. baumannii* MDR producono una combinazione di enzimi modificanti gli aminoglicosidi (Gallego e Towner, 2001; Nemec et al., 2004). Uno studio condotto in Cina ha identificato un ceppo di *A. baumannii* MDR portatore di quattro enzimi modificatori di aminoglicosidi (Zhu et al., 2009). Un altro studio condotto in Grecia ha riportato che tutti i ceppi di *A. baumannii* contengono enzimi che modificano gli aminoglicosidi (Ploy et al., 1994), cosa che indica l'elevata prevalenza di questi enzimi in *A. baumannii*.

8.3.5 ALTERAZIONE DEI SITI DI DESTINAZIONE

Le modifiche nei siti bersaglio degli antibiotici possono indurre resistenza agli antibiotici in *A. baumannii*. In assenza di altri meccanismi di resistenza noti, solo la sovraespressione di PBP alterate con una bassa affinità per l'imipenem induce resistenza all'imipenem (Gehrlein et al., 1991). La resistenza ai chinoloni è associata a modifiche di GyrA (una subunità della DNA girasi) e ParC (una subunità della topoisomerasi IV) in isolati di *A. baumannii* epidemiologicamente non correlati (Vila et al., 1995). La TetM di *Acinetobacter baumannii*, che ha un'omologia del 100% con la TetM di *S. aureus*, è stata proposta come associata alla resistenza alle tetracicline attraverso la protezione ribosomiale (Ribera et al., 2003b). Analogamente ad altri batteri patogeni, le diidrofolato reduttasi (DHFR e FolA) responsabili della resistenza al trimetoprim sono state trovate in isolati nosocomiali MDR *di A. baumannii (*Mak et al., 2009; Lin M. F. et al., 2013; Taitt et al., 2014). Anche la metilasi ArmA del 16S rRNA, responsabile della resistenza agli aminoglicosidi, si trova in molti ceppi di *A.*

baumannii e coesiste sempre con carbapenemasi di tipo OXA, come la OXA-23 (Yu et al., 2007; Cho et al., 2009; Karthikeyan et al., 2010; Brigante et al., 2012; Hong et al., 2013; Bakour et al., 2014; Tada et al., 2014; Hasani et al., 2016). Come descritto sopra, molti studi hanno dimostrato che le modifiche e/o la perdita di LPS diminuiscono la suscettibilità di *A. baumannii* a molti antibiotici di importanza clinica, come la colistina.

8.3.6 ALTRI

AdeABC è associato a una minore suscettibilità alla tigeciclina (Ruzin et al., 2007). Tuttavia, alcuni isolati clinici senza AdeABC, AdeFGH e AdeIJK sovraespressi presentano una minore suscettibilità alla tigeciclina. Diversi report hanno suggerito il meccanismo. Uno studio ha analizzato otto isolati clinici *di A. baumannii* e ha rilevato che la mutazione della delezione nel gene *trm*, che codifica la S-adenosil-L-metionina metiltransferasi dipendente, riduce la suscettibilità alla tigeciclina (Chen et al., 2014). È stato ottenuto lo stesso risultato con una piattaforma di *genome-editing* altamente efficiente e versatile che consente di modificare senza marcatori il genoma di *A. baumannii*. La delezione di AdeR, un fattore di trascrizione che regola l'espressione della pompa di efflusso AdeABC in *A. baumannii* resistente alla tigeciclina, riduce la MIC della tigeciclina. Tuttavia, il 60% degli isolati clinici è rimasto non suscettibile alla tigeciclina dopo la delezione di *adeR* secondo una piattaforma di *genome-editing* altamente efficiente e versatile (Trebosc et al., 2016). Il sequenziamento dell'intero genoma in due ceppi con delezione *adeR* resistenti alla tigeciclina ha rivelato che una mutazione nel gene *trm* rende il mutante *adeR* resistente alla tigeciclina. Inoltre, una mutazione *trm* è stata identificata nella maggior parte degli isolati clinici resistenti alla tigeciclina (Trebosc et al., 2016). Tuttavia, il suo meccanismo esatto non è stato determinato. Un altro studio ha rilevato che una mutazione *frameshift* in *pls*C, che codifica la *1-acil-sn-glicerolo-3-fosfato* aciltransferasi, è associata a una minore suscettibilità alla tigeciclina (Li X. et al., 2015).

Il gene *abrp*, che codifica la famiglia delle peptidasi C13, è associato a una minore suscettibilità a tetraciclina, minociclina, doxiciclina, tigeciclina, cloramfenicolo e fosfomicina (Li X. et al., 2016). La delezione di *abrp* aumenta la permeabilità della membrana cellulare, mostra un tasso di crescita cellulare più lento e conferisce una ridotta suscettibilità a questi antibiotici (Liu X. et al., 2016). Tuttavia, il suo meccanismo esatto non è stato determinato. Alcuni geni coinvolti nella divisione cellulare, tra cui *blhA*, *zipA*, *zapA* e *ftsK*, sono associati alla resistenza intrinseca ai β-lattamici in *A. baumannii* (Knight et al., 2016).

L'aumento dell'espressione di geni legati alla mutagenesi, come i geni di risposta SOS, è un meccanismo ben noto di *E. coli* e di altri batteri per ottenere resistenza agli antibiotici (Cirz e Romesberg, 2007). Anche *Acinetobacter baumannii* sembra avere una risposta che può essere indotta dal danno al DNA, laddove RecA svolge un ruolo regolatorio importante e sembra acquisire resistenze agli antibiotici in condizioni di danno al DNA clinicamente rilevanti (Aranda et al., 2011, 2014; Norton et al., 2013). Inoltre, RecA è coinvolto nella patogenicità di *A. baumannii* (Aranda et al., 2011).

8.4 POSSIBILI OPZIONI DI TRATTAMENTO

Sebbene i carbapenemi siano antibiotici efficaci per il trattamento delle infezioni *da A. baumannii* (Cisneros e Rodriguez-Bano, 2002; Turner et al., 2003), il tasso di isolati di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi è aumentato gradualmente (Mendes et al., 2010; Kuo et al., 2012; Su et al., 2012). Per il trattamento delle infezioni da *A. baumannii* MDR sono disponibili solo poche opzioni antibiotiche efficaci (Gordon e Wareham, 2009; Lee J. H. et al., 2015, 2016). Per combattere le infezioni da A. *baumannii* MDR o pandrug-resistenti (PDR), che sono resistenti a tutti gli antibiotici disponibili, sono state ampiamente studiate terapie di combinazione, tra cui colistina/imipenem, colistina/meropenem, colistina/rifampicina, colistina/tigeciclina, colistina/

sulbactam, colistina/teicoplanina e imipenem/sulbactam. Le possibili opzioni di trattamento delle infezioni *da Acinetobacter baumannii* sono riassunte nella Tabella 3. In questa sede verranno discussi i rapporti pubblicati più recenti.

Drugs	Type of research	Type of *A. baumannii*	Findings	References
Carbapenem +ampicillin+sulbactam+	*In vivo*	Carbapenem-resistant	Combination therapy with ampicillin-sulbactam and meropenem is effective against skin and soft tissue infection	Hinić et al., 2013
	In vivo	Multidrug-resistant	The combination of a carbapenem and ampicillin/sulbactam was associated with a better outcome than the combination of a carbapenem and amikacin, or a carbapenem alone	Kuo et al., 2007
Carbapenem +minocycline	*In vitro*	Multidrug-resistant	Minocycline in combination with rifampicin, imipenem, and colistin showed bactericidal synergy in most of the isolates which did not harbor the *tetB* gene, but the combinations were not synergistic in *tetB*-positive isolates	Rodriguez et al., 2015
Carbapenem +tigecycline+colistin	Case report	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	A patient with bacteremia had a favorable clinical outcome by a meropenem/colistin/tigecycline combination therapy	Candel et al., 2010
Carbapenem +colistin	*In vitro*/case report	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible	Effective, 80% of patients were treated successfully	Özbek and Seyhun, 2010
	In vitro	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Imipenem/colistin showed best synergy effects	Pongpech et al., 2010
	In vitro/case report	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Meropenem/colistin can inhibit bacterial regrowth at 24 h	Lee C. H. et al., 2008
	In vitro	Colistin-susceptible and colistin-resistant	Sub-inhibitory meropenem/colistin showed synergy against 49 of 52 strains at 24 h	Pankuch et al., 2008
	In vitro	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible	Combinations of colistin/rifampicin, colistin/meropenem, colistin/minocycline and minocycline/meropenem are synergistic	Liang et al., 2011
	A retrospective study	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible	Colistin/carbapenem and colistin/sulbactam resulted in significantly higher microbiological eradication rates, relatively higher cure and 14-day survival rates, and lower in-hospital mortality compared to colistin monotherapy in patients with bloodstream infections	Batirel et al., 2014
	In vitro	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Synergistic effects against all 12 isolates	Liu X. et al., 2016
	In vivo	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible and colistin-resistant	Colistin/fusidic acid and colistin/rifampicin were synergistic in a murine thigh-infection model; The colistin-meropenem combination was also effective when the colistin MIC is ≤32 mg/L.	Fan et al., 2016
	In vitro	Extensively drug-resistant	The daptomycin-colistin combination was the most effective; the colistin/imipenem combination was also effective	Cordoba et al., 2015
Carbapenem +colistin+rifampicin	Case report	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Successful treatment by a meropenem/colistin/rifampicin combination therapy in a case of multifocal infection	Biancofiore et al., 2007
Carbapenem+plazomicin	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Synergistic activity	García-Salguero et al., 2015
Imipenem+polymyxin B	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Doripenem, meropenem, or imipenem displayed similar pharmacodynamics in combination with polymyxin B	Lenhard et al., 2016b
Meropenem+ polymyxin B	*In vitro*	Multidrug-resistant	Combinations of polymyxin B/meropenem and polymyxin B/meropenem/fosfomycin showed high synergistic activity	Monaguoci et al., 2016
	In vitro/in vivo	Carbapenem-resistant	Intensified meropenem dosing in combination with polymyxin B synergistically killed carbapenem-resistant strains, irrespective of the meropenem MIC	Lenhard et al., 2016a
	In vitro	Carbapenem-resistant	Doripenem, meropenem, or imipenem displayed similar pharmacodynamics in combination with polymyxin B	Lenhard et al., 2016b
Doripenem+tigecycline	*In vitro*	Multidrug-resistant, doripenem-resistant	Synergistic activity	Principe et al., 2013
Doripenem+colistin	*In vitro*	Multidrug-resistant, doripenem-resistant	Synergistic activity	Principe et al., 2013
Doripenem+polymyxin B	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Doripenem, meropenem, or imipenem displayed similar pharmacodynamics in combination with polymyxin B	Lenhard et al., 2016b
	In vitro	Polymyxin-heteroresistant	The polymyxin B/doripenem combination resulted in rapid and extensive initial killing within 24 h, which was sustained over 10 days	Rao et al., 2016a
Doripenem+amikacin	*In vitro*	Multidrug-resistant, doripenem-resistant	Synergistic activity	Principe et al., 2013
Ampicillin+sulbactam	*In vitro/in vivo*	Multi-drug resistant	Ampicillin/sulbactam therapy significantly decreased the risk of death in patients with bloodstream infections	Smolyakov et al., 2003
Sulbactam+colistin	A retrospective study	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible	Colistin/carbapenem and colistin/sulbactam resulted in significantly higher microbiological eradication rates, relatively higher cure and 14-day survival rates, and lower in-hospital mortality compared to colistin monotherapy in patients with bloodstream infections	Batirel et al., 2014
	A retrospective study	Multidrug-resistant	The colistin/sulbactam combination therapy is promising in patients with ventilator-associated pneumonia	Kalin et al., 2014

Tazobactam+colistin	*In vivo*	Colistin-susceptible	Tazobactam plus colistin showed synergy	Sakoulas et al., 2016
Minocycline+colistin	*In vitro*	Extensively drug-resistant	Combinations of colistin/rifampicin, colistin/meropenem, colistin/minocycline and minocycline/meropenem are synergistic	Liang et al., 2011
	In vitro/in vivo	Minocycline-resistant	Minocycline/colistin synergistically killed minocycline-resistant isolates; minocycline/colistin also significantly improved the survival of mice and reduced the number of bacteria present in the lungs of mice	Yang et al., 2015
	In vitro	Multidrug-resistant	Minocycline in combination with rifampicin, imipenem, and colistin showed bactericidal synergy in most of the isolates which did not harbor the *tetB* gene, but the combinations were not synergistic in *tetB*-positive isolates	Rodriguez et al., 2015
Minocycline+rifampicin	*In vivo*	Multidrug-resistant	Synergistic effect of minocycline/rifampicin and minocycline/amikacin combinations in a mouse lung infection model	He S. et al., 2015
	In vitro	Multidrug-resistant	Minocycline in combination with rifampicin, imipenem, and colistin showed bactericidal synergy in most of the isolates which did not harbor the *tetB* gene, but the combinations were not synergistic in *tetB*-positive isolates	Rodriguez et al., 2015
Minocycline+amikacin	*In vivo*	Multidrug-resistant	Synergistic effect of minocycline/rifampicin and minocycline/amikacin combinations in a mouse lung infection model	He S. et al., 2015
Tigecycline+colistin	*In vitro*	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Good synergy	Cubek and Senturk, 2010; Sheng et al., 2011
	In vitro	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible	Good synergy	Dubey et al., 2010
	In vitro	Tigecycline-non-susceptible	Good synergy	Principe et al., 2009
	In vitro	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible and colistin-resistant	Good synergy	Peck et al., 2012
	In vitro/in vivo	Extensively drug-resistant	*In vitro* synergistic activity; no statistically significant differences were found between colistin, tigecycline, and combination treatments in terms of efficacy on bacterial counts in lung tissue of a rat pneumonia model	Multu Yilmaz et al., 2012
Tigecycline+polymyxin B	*In vitro*	Carbapenem-resistant, polymyxin-heteroresistant	Combination of polymyxin B with higher tigecycline concentrations result in sustained bactericidal activity	Rao et al., 2016b
	In vitro	Carbapenem-resistant	Synergistic effects in combination therapy with simulated exposures of polymyxin B and tigecycline at an aggressive dose	Hughes et al., 2014
Tigecycline+amikacin	*In vitro*	Multidrug-resistant	Synergistic bactericidal activities	Meland et al., 2008
Colistin+rifampicin	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Efficacy *in vitro* and in experimental models of pneumonia and meningitis	Pachon-Ibanez et al., 2010
	Case report	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Efficacy in 7 of 10 patients with ventilator-associated pneumonia	Song et al., 2008
	Case report	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Efficacy in 22 of 29 critically ill patients with pneumonia and bacteremia	Bassetti et al., 2008
	In vivo	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Synergistic effect in prolonging survival	Pantopoulou et al., 2007
	Clinical trial	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Favorable for all 26 nosocomial infection patients	Motsoukikli et al., 2008
	In vitro	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Effective for strains highly resistant to imipenem and moderately resistant to rifampicin	Montero et al., 2004
	In vitro	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Synergistic effect against 11 of 13 isolates	Hogg et al., 1998
	In vitro	Extensively drug-resistant	Combinations of colistin/rifampicin, colistin/meropenem, colistin/minocycline and minocycline/meropenem are synergistic	Liang et al., 2011
	In vitro	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Colistin/rifampicin was fully synergistic against 4 of 5 isolates; colistin/meropenem and colistin/azithromycin were synergistic against 3 of 5 isolates; colistin/doxycycline was partially synergistic or additive against 5 isolates	Timurkaynak et al., 2006
	Case report	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Rifampicin/colistin and ampicillin/sulbactam resulted in microbiological clearance in 9 of 14 critically ill patients	Petrosillo et al., 2005
	In vitro	Carbapenem-resistant, colistin-heteroresistant	Rifampicin/colistin and imipenem/colistin were synergistic against heteroresistant isolates and prevented the development of colistin-resistant strains	Rodriguez et al., 2010
	Case report	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Synergistic effect in patients with ventilator-associated pneumonia	Aydemir et al., 2013
	In vivo	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible and colistin-resistant	Colistin/fusidic acid and colistin/rifampicin were synergistic in a murine thigh-infection model; The colistin-meropenem combination was also effective when the colistin MIC is ≤32 mg/L.	Fan et al., 2015
	In vitro	Colistin-resistant	The most effective combinations were colistin-rifampin and colistin-teicoplanin; both combinations showed synergistic effect against 8 of 9 colistin-resistant strains	Bae et al., 2014
Colistin+teicoplanin	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Synergistic effect of colistin/daptomycin and colistin/teicoplanin in a mouse model	Cirioni et al., 2016
	In vitro	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Significant synergy	Wareham et al., 2011
	In vitro	Colistin-resistant	The most effective combinations were colistin-rifampin and colistin-teicoplanin; both combinations showed synergistic effect against 8 of 9 colistin-resistant strains	Bae et al., 2014
Colistin+daptomycin	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Synergistic effect of colistin/daptomycin and colistin/teicoplanin in a mouse model	Cirioni et al., 2016
	In vitro	Extensively drug-resistant	The daptomycin-colistin combination was the most effective; the colistin/imipenem combination was also effective	Cardoso et al., 2015
Colistin+vancomycin	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Highly active both in vitro and in an animal model of *Galleria mellonella*	Hornsey and Wareham, 2011

Colistin+fosfomycin	*In vitro*	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible	Good synergy; no synergy between colistin and sulbactam, colistin and imipenem	Santimaleeworagun et al., 2011
Colistin+fusidic acid	*In vitro*	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible and colistin-resistant	*In vitro* synergy between colistin and fusidic acid that is comparable to the synergy between colistin and vancomycin; the synergy with fusidic acid is strain-dependent and applicable to strains for which the colistin MICs are relatively low	Bowler et al., 2016
	In vitro	Carbapenem-resistant, colistin-susceptible and colistin-resistant	Robust synergy between fusidic acid and colistin against multidrug-resistant clinical strains, including some colistin-resistant strains	Phee et al., 2015
	In vivo	Extensively drug-resistant, colistin-susceptible and colistin-resistant	Colistin/fusidic acid and colistin/rifampicin were synergistic in a murine thigh-infection model; The colistin-meropenem combination was also effective when the colistin MIC is ≤32 mg/L.	Fan et al., 2016
Colistin+amikacin	Case report	Multidrug-resistant, colistin-susceptible	Successful clinical and microbiological outcomes	Fulnecky et al., 2005
Colistin+trimethoprim-sulfamethoxazole	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Colistin/trimethoprim-sulfamethoxazole killed effectively all carbapenem-resistant strains	Napisa et al., 2015
Polymyxin B+retropsin	*In vitro/in vivo*	Colistin-resistant	The survival of infected *Galleria mellonella* was significantly higher when treated with polymyxin B and retropsin in combination than when treated with polymyxin B or retropsin alone	Chung et al., 2016
Trimethoprim-sulfamethoxazole	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Trimethoprim-sulfamethoxazole killed effectively all carbapenem-resistant strains	Napisa et al., 2015
Novobiocin	*In vitro*	Carbapenem-susceptible	Inhibition of frequency of the occurrence of rifampin resistance mutants	Jara et al., 2015
Bacteriophages	*In vitro/in vivo*	Carbapenem-resistant, carbapenem-susceptible	Strong lytic activities and the improvement of survival rates	Jeon et al., 2016; Kumadre et al., 2016
Endolysin (LysABP-01)+colistin	*In vitro*	Multidrug-resistant	Synergistic activity	Thummeepak et al., 2016
Artilysins	*In vitro*	Carbapenem-resistant, carbapenem-susceptible	Artilysins are effective *in vitro* and *in vivo*	Briers et al., 2014; Yang et al., 2015; Defraine et al., 2016; Thandar et al., 2016
Antimicrobial peptides	*In vitro*	Multidrug-resistant	Good antimicrobial activities	Pires et al., 2015; Barksdale et al., 2016
Rose bengal+carbapenem	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Imipenem or meropenem with rose bengal showed synergistic effects	Chiu et al., 2016
β-Aminoketone (MD3)+colistin	*In vitro*	Colistin-susceptible, colistin-resistant	Synergistic effect targeting to strains with specific colistin resistance mechanisms; synergy against both colistin-susceptible strains and colistin-resistant strains with mutations in *pmrB* and phosphoethanolamine modification of lipid A, but not against colistin-resistant strains with loss of lipopolysaccharide	Martinez-Guitian et al., 2016
Bulgecin A+ carbapenem	*In vitro*	Carbapenem-resistant	Synergistic activity	Shalwati and Li, 2016
Farnesol+colistin	*In vitro*	Colistin-resistant	Farnesol increased sensitivity to colistin for colistin-resistant strains	Kostoulias et al., 2015
Oleanolic acid+gentamicin or kanamycin	*In vitro*	Carbapenem-susceptible	Synergistic activity	Shin and Park, 2015
Cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)+colistin	*In vitro*	Colistin-resistant	CCCP reversed colistin resistance and inhibited the regrowth of the resistant subpopulation	Ni et al., 2016
	In vitro	Colistin-resistant	Synergistic activity	Park and Ko, 2015
ABEP11 or ABEP12+minocycline	*In vitro*	Carbapenem-susceptible	Synergistic activity	Blanchard et al., 2014
Gallium nitrate	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant	Good antimicrobial activities; protection of *Galleria mellonella* larvae from lethal *A. baumannii* infection; synergistic activity with colistin	Antunes et al., 2012
Gallium protoporphyrin IX	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant	Good antimicrobial activities	Arivett et al., 2015
Gallium nitrate+colistin	*In vitro/in vivo*	Multidrug-resistant	Good antimicrobial activities; protection of *Galleria mellonella* larvae from lethal *A. baumannii* infection; synergistic activity with colistin	Antunes et al., 2012
D-amino acids	*In vitro/in vivo*	Carbapenem-susceptible	Some D-amino acids (D-histidine and D-cysteine) can inhibit bacterial growth, biofilm formation and adherence to eukaryotic cells	Rumbo et al., 2016
Bifidobacterium breve strain Yakult	*In vivo*	Multidrug-resistant	Protection against fatal intestinal infection in a murine infection model	Asahara et al., 2016
Clarithromycin	*In vivo*	Multidrug-resistant	Inhibition of bacterial growth and biofilm formation; immunomodulator	Konstantinidis et al., 2016
Lysophosphatidylcholine +carbapenem	*In vivo*	Multidrug-resistant strain	Lysophosphatidylcholine in combination with colistin, tigecycline, or imipenem markedly enhanced the bacterial clearance from the spleen and lungs and reduced bacteremia and mouse mortality rates	Parra Millan et al., 2016
Lysophosphatidylcholine +tigecycline	*In vivo*	Multidrug-resistant strain	Lysophosphatidylcholine in combination with colistin, tigecycline, or imipenem markedly enhanced the bacterial clearance from the spleen and lungs and reduced bacteremia and mouse mortality rates	Parra Millan et al., 2016
Lysophosphatidylcholine +colistin	*In vivo*	Multidrug-resistant strain	Lysophosphatidylcholine in combination with colistin, tigecycline, or imipenem markedly enhanced the bacterial clearance from the spleen and lungs and reduced bacteremia and mouse mortality rates	Parra Millan et al., 2016

TABELLA 3. *Possibili opzioni di trattamento delle infezioni da Acinetobacter Baumannii.*

8.4.1 CARBAPENEMI E INIBITORI DELLE β-LATTAMASI

I carbapenemi, tra cui imipenem, meropenem e doripenem, sono stati generalmente considerati gli agenti per il trattamento delle infezioni *da A. baumannii*, grazie alla loro efficace attività contro questo organismo e alla loro sicurezza (Doi et al., 2015). Tuttavia, la diminuita suscettibilità di *A. baumannii* ai carbapenemi ha costretto medici e ricercatori a cercare approcci terapeutici alternativi (Doi et al., 2015). Poiché i ceppi di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi sono spesso resistenti anche a tutti gli altri antibiotici comunemente utilizzati, questi ceppi rimangono sensibili solo a un numero limitato di antibiotici, come la minociclina/tigeciclina e le polimixine (colistina e polimixina B; Lin e Lan, 2014; Doi et al., 2015). Le terapie con carbapenemi combinate con alcuni antibiotici efficaci sono state ampiamente testate e in molti casi hanno mostrato un effetto sinergico contro le infezioni *da A. baumannii* (Tabella 3). Tuttavia, il recente aumento di *A. baumannii* resistenti alla tigeciclina o alla colistina rappresenta sempre una minaccia sempre più grave per la salute pubblica mondiale (Peleg et al., 2007; Hornsey et al., 2010; Cai et al., 2012).

Il sulbactam è un inibitore delle β-lattamasi e ha anche affinità per le proteine leganti la penicillina di *A. baumannii* (Rafailidis et al., 2007; Doi et al., 2015). La terapia combinata di ampicillina e sulbactam è efficace per il trattamento delle infezioni del flusso sanguigno dovute ad *A. baumannii* MDR (Smolyakov et al., 2003). La terapia di combinazione ampicillina/sulbactam/carbapenemi è efficace anche per il trattamento della batteriemia da *A. baumannii* MDR (Kuo et al., 2007) e dell'infezione della pelle e dei tessuti molli da *A. baumannii* resistente ai carbapenemi (Hiraki et al., 2013), ma non nella polmonite associata a ventilazione (Kalin et al., 2014). La farmacocinetica e la farmacodinamica di popolazione del sulbactam sono state determinate in pazienti critici con sepsi grave causata da *A. baumannii* (Jaruratanasirikul et al., 2016) e in pazienti con funzionalità renale compromessa (Yokoyama et al., 2015). Un altro inibitore delle β-lattamasi, il

tazobactam, aumenta l'attività degli antibiotici peptidici, come la colistina e la daptomicina, in un modello murino di polmonite *da A. baumannii* (Sakoulas et al., 2016). Gli autori hanno suggerito che gli inibitori delle β-lattamasi possano esercitare effetti simili nel potenziare gli antibiotici peptidici, a causa delle somiglianze strutturali tra gli inibitori delle β-lattamasi e gli antibiotici peptidici (Sakoulas et al., 2016).

8.4.2 MINOCICLINA/TIGECICLINA

La minociclina è un antibiotico tetraciclina ad ampio spettro che è stato proposto per il trattamento dell'*A. baumannii* resistente ai farmaci, grazie all'elevato grado di suscettibilità a questo farmaco e al suo profilo farmacocinetico favorevole (Ritchie e Garavaglia-Wilson, 2014). Il tasso medio di suscettibilità di *A. baumannii* alla minociclina è di circa l'80% in tutto il mondo (Castanheira et al., 2014). Pertanto, la terapia con minociclina presenta alti tassi di successo terapeutico e una buona tollerabilità (Ritchie e Garavaglia-Wilson, 2014). Tuttavia, dall'introduzione della minociclina, circa il 20% degli isolati *di A. baumannii* non è sensibile alla minociclina. La pompa di efflusso TetB è il principale determinante della resistenza alla minociclina (Vilacoba et al., 2013). La terapia con minociclina combinata con colistina è efficace per il trattamento delle infezioni da *A. baumannii* resistenti alla minociclina (Yang et al., 2016) e la terapia con minociclina combinata con rifampicina, colistina o imipenem ha un effetto sinergico nella maggior parte degli isolati senza il gene *tetB*, ma le terapie combinate non sono sinergiche negli isolati con il gene *tetB* (Rodriguez et al., 2015).

La tigeciclina è il primo antibiotico della classe delle glicicline che mostra attività batteriostatica legandosi alla subunità ribosomiale 30S ed è attiva contro le infezioni *da A. baumannii* (Pachon-Ibanez et al., 2004; Anthony et al., 2008; Koomanachai et al., 2009). La tigeciclina mostra un effetto sinergico con alcune classi di antibiotici, come l'amikacina (Moland et al., 2008) e la colistina (Mutlu Yilmaz et al., 2012). Tuttavia, con l'aumento dell'uso

della tigeciclina sono emerse delle limitazioni. La tigeciclina è meno efficace dell'imipenem nel trattamento della polmonite in un modello di polmonite murina (Pichardo et al., 2010). Per le infezioni da *A. baumannii* con una MIC di tigeciclina superiore a 2 mg/L è stato raccomandato l'uso di β-lattamici o carbapenemi al posto della tigeciclina, a causa dell'elevata mortalità dovuta al trattamento con quest'ultima (Curcio e Fernandez, 2008). In uno studio condotto su 266 pazienti con infezioni *da A. baumannii* MDR, la terapia a base di tigeciclina non è risultata più efficace delle terapie senza tigeciclina (Lee Y. T. et al., 2013). La resistenza alla tigeciclina associata alla sovraespressione di pompe di efflusso, come AdeABC, è stata riportata in isolati clinici di *A. baumannii* (Peleg et al., 2007; Ruzin et al., 2007; Hornsey et al., 2010, 2011). In molti centri medici sono stati segnalati diversi cloni di *A baumannii* MDR resistenti alla tigeciclina (Navon-Venezia et al., 2007). Pertanto, la tigeciclina può essere utilizzata solo in casi limitati per il trattamento delle infezioni *da A. baumannii*.

8.4.3 POLIMIXINE (COLISTINA E POLIMIXINA B)

Le polimixine sono un gruppo di antibiotici peptidici policationici scoperti più di 60 anni fa e mostrano una potente efficacia contro la maggior parte dei batteri Gram-negativi (Liu Q. et al., 2014; Lee C. R. et al., 2016). Tra le cinque polimixine (A-E), solo la polimixina B ed E (colistina), con una differenza di un aminoacido, sono utilizzate clinicamente. La colistina è un componente chiave delle terapie di combinazione utilizzate per trattare le infezioni da *A. baumannii* MDR (Cai et al., 2012). Il tasso di resistenza alla colistina (10,4%) negli isolati di *A. baumannii* MDR è inferiore a quello della resistenza alla rifampicina (47,8%) o alla tigeciclina (45,5%) (Chang et al., 2012). Sono stati riportati dei risultati simili in un altro studio (Muthusamy et al., 2016). Pertanto, la colistina sembra essere l'unico agente antimicrobico efficace contro le infezioni da *A. baumannii* MDR. Numerose terapie combinate a base di colistina, tra cui colistina/rifampicina (Liang et al., 2011; Aydemir et al., 2013), colistina/

minociclina (Liang et al., 2011), colistina/carbapenem (Liang et al., 2011; Batirel et al., 2014; Liu X. et al., 2016), colistina/sulbactam (Batirel et al., 2014), colistina/tigeciclina (Principe et al, 2009; Ozbek e Senturk, 2010; Sheng et al., 2011; Peck et al., 2012), colistina/daptomicina (Cirioni et al., 2016), colistina/acido fusidico (Bowler et al., 2016; Fan et al., 2016) e colistina/teicoplanina (Wareham et al., 2011; Cirioni et al., 2016), sono sinergici *in vivo* o *in vitro* contro le infezioni *da A. baumannii*. La terapia con colistina combinata con rifampicina o acido fusidico sembra essere la più efficace per il trattamento di *A. baumannii* MDR in un modello di infezione murino della coscia (Fan et al., 2016). Un altro report che confronta colistina/daptomicina, colistina/imipenem e imipenem/ertapenem ha dimostrato che la combinazione daptomicina-colistina è la più efficace (Cordoba et al., 2015).

Purtroppo, la comparsa di ceppi di *A. baumannii* resistenti alla colistina è aumentata in tutto il mondo (Cai et al., 2012). I meccanismi di resistenza alla colistina includono la perdita di LPS (Moffatt et al., 2010) e l'aggiunta di fosfoetanolammina all'LPS da parte del sistema bicomponente PmrAB (Adams et al., 2009). Mutazioni in *pmrA* e *pmrB* attivano *pmrC*, che aggiunge fosfoetanolammina alla forma epta-acilata del lipide A (Beceiro et al., 2011). È interessante notare che un'indagine sull'attività *in vitro* di varie combinazioni antimicrobiche contro *A. baumannii* resistente alla colistina ha mostrato che le combinazioni più efficaci contro *A. baumannii* resistente alla colistina sono colistina-rifampicina e colistina-teicoplanina, indicando che la colistina è il componente più comune delle combinazioni antimicrobiche anche contro *A. baumannii* resistente alla colistina (Bae et al., 2016). Analogamente, la terapia con minociclina in combinazione con la colistina è efficace per trattare le infezioni causate da *A. baumannii* resistente alla minociclina. La terapia con minociclina/colistina migliora significativamente la sopravvivenza dei topi infettati con *A. baumannii* resistente alla minociclina e riduce il numero di batteri presenti nei polmoni dei topi (Yang et al., 2016).

Nel 1994 è stato segnalato un isolato di *Enterococcus faecalis* del tratto urinario che apparentemente richiede la vancomicina per crescere, e questo fenomeno è chiamato "dipendenza da agenti antimicrobici". La dipendenza da colistina è stata segnalata in un complesso A. baumannii-A. *calcoaceticus* (Hawley et al., 2007). La dipendenza parziale dalla colistina è stata rilevata in diversi ceppi con deficienza di LPS con mutazioni in *lpxA, lpxC* e *lpxD* (Garcia-Quintanilla et al., 2015). Molti isolati di *A. baumannii* sensibili alla colistina sviluppano dipendenza dalla colistina *in vitro* dopo l'esposizione alla colistina (Hong et al., 2016). Sebbene l'implicazione clinica della dipendenza da colistina e il suo meccanismo molecolare rimangano poco chiari, è interessante il fatto che i pazienti con isolati di *A. baumannii* dipendenti da colistina mostrino un'alta percentuale di fallimento del trattamento (Hong et al., 2016).

A differenza della colistina, la polimixina B non viene convertita da profarmaco in forma attiva; pertanto, le concentrazioni plasmatiche di polimixina B raggiungono più rapidamente i livelli target (Sandri et al., 2013). Inoltre, la polimixina B è disponibile per la somministrazione parenterale diretta (Zavascki et al., 2007). Nonostante la farmacocinetica favorevole della polimixina B, la nefrotossicità legata alla dose limita la concentrazione di polimixina B utilizzata nella terapia di combinazione (Dubrovskaya et al., 2015). Ecco perché quasi tutti gli studi sulle polimixine sono stati condotti sulla colistina. Dato che però alcuni carbapenemi hanno una modulazione della dose relativamente più sicura per ottimizzare l'uccisione durante la terapia di combinazione (Cannon et al., 2014), diversi studi hanno analizzato la farmacodinamica dei carbapenemi in combinazione con la polimixina B (Lenhard et al., 2016a,b; Rao et al., 2016a). Uno studio ha dimostrato che il dosaggio intensificato di meropenem in combinazione con polimixina B è una buona strategia per trattare *A. baumannii* resistente ai carbapenemi, indipendentemente dalla MIC di meropenem (Lenhard et al., 2016a). Anche la terapia di combinazione con doripenem e polimixina B ha mostrato risultati simili. Il dosaggio aggressivo precoce di dori-

penem combinato con polimixina B è efficace per il trattamento delle infezioni *da A. baumannii* eteroresistenti (Rao et al., 2016a). Un'analisi farmacodinamica combinata di quattro diversi carbapenemi con la polimixina B ha dimostrato che doripenem, meropenem o imipenem mostrano una farmacodinamica simile in combinazione e la decisione di utilizzare i carbapenem in combinazione con la polimixina B si basa solitamente sui profili tossicodinamici (Lenhard et al., 2016b). La polimixina B mostra anche una buona attività battericida in combinazione con alte concentrazioni di tigeciclina (Hagihara et al., 2014; Rao et al., 2016b). Pertanto, le terapie di combinazione con polimixina B sembrano essere una delle opzioni più promettenti per ridurre al minimo l'emergere della resistenza alla polimixina. L'aumento dell'intensità della dose di polimixina B amplifica la resistenza alla polimixina B in *A. baumannii* (Cheah et al., 2016; Tsuji et al., 2016). In conclusione, sebbene la polimixina B mostri una nefrotossicità correlata alla dose, potrebbe essere un'alternativa terapeutica alla colistina se utilizzata insieme a dosi più alte di altri antibiotici. È stato effettuato uno screening su larga scala di metaboliti secondari *di Streptomyces* per sviluppare una nuova terapia di combinazione utilizzando concentrazioni minime di polimixina B ed è stato identificato il sinergizzante affidabile della polimixina, la netropsina (Chung et al., 2016). La sopravvivenza di *G. mellonella* infettata con isolati clinici di *A. baumannii* resistenti alla colistina è significativamente più alta quando viene trattata con polimixina B combinata con netropsina rispetto a quando viene trattata con polimixina B o netropsina da sola (Chung et al., 2016).

8.4.4 ALTRI ANTIBIOTICI

Il trimetoprim-sulfametossazolo è una combinazione di due antibiotici che esercita un effetto sinergico inibendo fasi successive della via di sintesi del folato contro diversi batteri (Wormser et al., 1982). Recentemente è stata studiata l'attività di abbattimento *in vitro* del trimetoprim-sulfametossazolo contro *A. baumannii*

resistente ai carbapenemi. Il trimetoprim-sulfametossazolo da solo uccide efficacemente tutti i ceppi di *A. baumannii* resistenti ai carbapenem e anche il trimetoprim-sulfametossazolo combinato con la colistina uccide rapidamente tutti i ceppi fino a 24 ore (Nepka et al., 2016). Questi risultati suggeriscono che il trimetoprim-sulfametossazolo potrebbe essere una terapia efficace per le infezioni gravi da *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi. La plazomicina è un aminoglicoside di nuova generazione derivato sinteticamente dalla sisomicina che potenzia l'attività contro molti batteri Gram-negativi MDR (Garcia-Salguero et al., 2015). È stato osservato un effetto sinergico con i carbapenemi insieme alla plazomicina durante il trattamento delle infezioni *da A. baumannii* (Garcia-Salguero et al., 2015), indicando la potenziale utilità della plazomicina in combinazione con i carbapenemi.

La risposta inducibile al danno al DNA in *A. baumannii* svolge un ruolo importante nell'acquisizione della resistenza agli antibiotici in condizioni di danno al DNA clinicamente rilevanti (Aranda et al., 2011, 2014; Norton et al., 2013). L'aminocumarina novobiocina è un agente antimicrobico consolidato che inibisce la risposta al danno del DNA nei batteri Gram-positivi interferendo con l'attività ATPasi della DNA girasi (Schroder et al., 2013). Uno studio ha dimostrato che la novobiocina inibisce anche l'acquisizione della resistenza antimicrobica in *A. baumannii* MDR attraverso la mutagenesi indotta dal danno al DNA (Jara et al., 2015).

8.4.5 TERAPIE NON ANTIBIOTICHE: FAGI E ALTRI

La diffusione di patogeni MDR nel mondo ha rinnovato l'interesse per la terapia con batteriofagi, virus che infettano e lisano i batteri. Vari batteriofagi litici di *A. baumannii*, come *vB_Ab-M-G7* (Kusradze et al., 2016) e Bϕ-C62 (Jeon et al., 2016), sono stati utilizzati per trattare le infezioni causate da *A. baumannii* MDR. Anche l'endolisina codificata da batteriofagi ha ricevuto una certa attenzione. L'endolisina è un enzima litico che degrada la parete cellulare degli ospiti batterici e si rivela promettente

come nuova classe di antibatterici con una modalità d'azione unica (Defraine et al., 2016). Ad esempio, l'endolisina del batteriofago ØABP-01 degrada la parete cellulare grezza dei ceppi di *A. baumannii* e aumenta l'attività antibatterica se combinata con la colistina (Thummeepak et al., 2016). Tuttavia, la maggior parte dei patogeni Gram-negativi non è generalmente sensibile alle endolisine, a causa della membrana protettiva esterna (Lee et al., 2013a). Per superare questo problema, le endolisine sono state ingegnerizzate di recente con specifici peptidi destabilizzanti della membrana esterna per ottenere la capacità di penetrare la membrana esterna; queste endolisine ingegnerizzate sono chiamate "artilisine" (Rodriguez-Rubio et al., 2016). Sono state sviluppate diverse artilisine ingegnerizzate per combattere l'*A. baumannii* MDR; queste mostrano un'attività antimicrobica altamente efficace contro *A. baumannii* (Briers et al., 2014; Yang et al., 2015; Defraine et al., 2016; Thandar et al., 2016). Questi risultati suggeriscono che le artilisine possono essere un'opzione terapeutica per *A. baumannii* MDR. La diversità della popolazione fagica è stata determinata mediante l'analisi dei viromi, delle endolisine e degli spaziatori CRISPR (Davison et al., 2016). Questi risultati possono essere utilizzati per aiutare a trovare un'endolisina efficace per combattere *A. baumannii* MDR. Diversi peptidi, come il peptide plasmatico dell'alligatore americano (Barksdale et al., 2016) e il peptide dendrimero antimicrobico G3KL (Pires et al., 2015), hanno un'attività antimicrobica *in vitro* contro MDR *A. baumannii*. Tuttavia, l'uso di enzimi o peptidi antimicrobici presenta anche alcuni problemi importanti, come la loro breve emivita nel siero e gli elevati costi di produzione rispetto a quelli di molecole più piccole.

Un'analisi *in silico ha* previsto che OXA-58, OXA-23 e OXA-83 sono traslocate nel periplasma attraverso il sistema Sec (Liao et al., 2015; Chiu et al., 2016). Un inibitore di SecA (rosa Bengala) inibisce la traslocazione periplasmatica di queste β-lattamasi di classe D che idrolizzano i carbapenemi, indicando che queste β-lattamasi sono rilasciate selettivamente attraverso un sistema Sec-dipendente (Liao et al., 2015; Chiu et al., 2016). Imipenem o

meropenem combinati con rosa bengala mostrano effetti sinergici per gli isolati clinici di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi (Chiu et al., 2016). Analogamente, il β-aminoketone (MD3), un inibitore delle peptidasi di segnale batteriche di tipo I che scinde i peptidi di segnale amino-terminali delle proteine traslocate, mostra un effetto sinergico se combinato con la colistina contro i ceppi di *A. baumannii* resistenti alla colistina (Martinez-Guitian et al., 2016).

La bulgecina A è un prodotto naturale di *P. mesoacidophila* e un inibitore della transglicosilasi litica che agisce sinergicamente con i β-lattamici (Skalweit e Li, 2016). La bulgecina A ripristina l'efficacia del meropenem nel sopprimere la crescita di ceppi di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi, suggerendo che la bulgecina A possa essere un composto aggiuntivo per prolungare la durata dei carbapenemi contro le infezioni da *A. baumannii* (Skalweit e Li, 2016). Analogamente, il farnesolo, un prodotto naturale di *Candida albicans* per il *quorum-sensing*, interrompe l'integrità della membrana cellulare di *A. baumannii*, altera la morfologia cellulare e aumenta la sensibilità dei ceppi MDR di *A. baumannii* alla colistina (Kostoulias et al., 2015). Molti composti attivi vegetali hanno forti poteri antibatterici contro molti batteri, tra cui *A. baumannii* resistente ai carbapenemi (Lin et al., 2015). Ad esempio, l'acido oleanolico è un composto triterpenoide ampiamente presente negli alimenti, nelle erbe medicinali e in molte piante, in grado di inibire efficacemente diversi batteri patogeni. Uno studio ha dimostrato che l'acido oleanolico aumenta l'assorbimento degli aminoglicosidi modificando la permeabilità della membrana e il metabolismo energetico in *A. baumannii* (Shin e Park, 2015).

Il cianuro 3-clorofenilidrazone (CCCP) è un inibitore della pompa di efflusso che diminuisce la MIC della colistina nei ceppi di *A. baumannii* sensibili e resistenti alla colistina (Park e Ko, 2015; Ni et al., 2016). Altri inibitori della pompa di efflusso, come ABEPI1 e ABEPI2, inibiscono la tolleranza alla minociclina mediata dall'efflusso di *A. baumannii*. L'aggiunta di questi composti durante la crescita nel siero umano porta all'accumulo

di minociclina all'interno di *A. baumannii* e inibisce il potenziale di efflusso del batterio (Blanchard et al., 2014).

Il gallio è un elemento semi-metallico del gruppo 13 della tavola periodica che si lega ai complessi biologici contenenti Fe3+ e altera i processi biologici essenziali guidati dalle redox (Bernstein, 1998). Il gallio è stato utilizzato come semplice sale inorganico o organico o complessato con composti organici. Diversi studi hanno dimostrato che il nitrato di gallio o la protoporfirina IX potrebbero essere una valida opzione terapeutica per il trattamento di *A. baumannii* MDR (Antunes et al., 2012; Arivett et al., 2015). Alcuni D-aminoacidi, come il D-His e il D-Cys, inibiscono la crescita batterica, la formazione di biofilm e l'adesione alle cellule eucariotiche in *A. baumannii* (Rumbo et al., 2016).

I probiotici sono "microrganismi vivi che conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite quando vengono somministrati in quantità adeguate" (Reid et al., 2005) e contribuiscono a proteggere dalle infezioni da *A. baumannii* MDR. Ad esempio, è stata studiata la capacità del probiotico *Bifidobacterium breve* di proteggere dalle infezioni da *A. baumannii* MDR (Asahara et al., 2016). Questo probiotico potenzia notevolmente la protezione contro le infezioni intestinali fatali causate da *A. baumannii* MDR (Asahara et al., 2016). Con i probiotici, gli immunomodulatori, come la lisofosfatidilcolina (Parra Millan et al., 2016) e gli antibiotici macrolidi come la claritromicina (Konstantinidis et al., 2016), possono ridurre la gravità dell'infezione *da A. baumannii* stimolando la risposta immunitaria, se combinati con antibiotici come la colistina, la tigeciclina o l'imipenem.

8.5 CONCLUSIONE

Il numero di studi su *A. baumannii* è in forte aumento a causa della sua crescente importanza clinica. L'uso di modelli animali ha prodotto dati importanti sui fattori di virulenza che contribuiscono alla patogenesi *di A. baumannii*. In particolare, sono interessanti alcuni studi sull'acquisizione dei metalli e sui sistemi

di secrezione delle proteine. Oltre ai sistemi di acquisizione del ferro come l'acinetobactina, la scoperta di sistemi di acquisizione dello zinco e del manganese in *A. baumannii* amplia la nostra comprensione della patogenesi *di A. baumannii*. Sono necessari studi più approfonditi sui vari sistemi di secrezione proteica presenti in *A. baumannii*. Sono stati identificati mediante uno screening con trasposoni in larve di *G. mellonella* circa 300 geni necessari per la sopravvivenza *in vivo* di *A. baumannii* (Gebhardt et al., 2015). Poiché molti di questi geni non erano noti per essere associati alla patogenesi *di A. baumannii*, sono necessari degli studi più approfonditi per determinare se questi geni sono correlati alla patogenesi di *A. baumannii*. Inoltre, lo screening dei trasposoni in altri animali modello fornirà nuove conoscenze sulla patogenesi di *A. baumannii*. La conoscenza dei fattori di virulenza responsabili della patogenesi *di A. baumannii* sarà la chiave di volta per lo sviluppo di nuovi antibiotici. Ad esempio, l'LPS è un importante fattore di virulenza e l'inibitore di LpxC, che inibisce la sintesi di LPS, protegge completamente i topi dall'infezione in forma letale (Lin et al., 2012). Questi risultati indicano che il blocco della sintesi di LPS è una strategia potente per scoprire nuovi antibiotici. Tuttavia, nonostante i recenti e approfonditi studi sulla patogenesi *di A. baumannii*, la tossicità e la patogenicità di *A. baumannii* rimangono poco chiare.

Il recente interesse per *A. baumannii* è dovuto soprattutto alla sua capacità apparentemente infinita di acquisire resistenza agli antibiotici. *A. baumannii* possiede quasi tutti i meccanismi di resistenza batterica. Tutte le β-lattamasi sono state rilevate in *A. baumannii* e la frequenza di isolati di *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi è molto elevata. Inoltre, quasi tutti gli *A. baumannii* contengono enzimi che modificano gli aminoglicosidi e in *A. baumannii* sono state identificate molte pompe di efflusso responsabili della resistenza a vari antibiotici clinicamente importanti. A causa di queste capacità, gli antibiotici disponibili per il trattamento delle infezioni *da A. baumannii* sono molto limitati. La colistina è utilizzata come trattamento antibiotico di ultima istanza, grazie al suo tasso di resistenza relativamente bas-

so. Tuttavia, l'emergenza di ceppi di *A. baumannii* resistenti alla colistina è aumentata in tutto il mondo con l'aumento dell'uso della colistina. In particolare, alcuni studi più recenti hanno suggerito un altro antibiotico polimixina, la polimixina B, come potenziale alternativa terapeutica alla colistina (Lenhard et al., 2016a,b; Rao et al., 2016a; Repizo et al., 2015). La polimixina B non è stata un buon antibiotico a causa della nefrotossicità dose-dipendente, ma recenti report dimostrano che una nuova terapia di combinazione con carbapenemi o tigeciclina utilizzando concentrazioni minime di polimixina B può essere una buona strategia per trattare le infezioni *da A. baumannii* resistenti ai carbapenemi. Questi risultati indicano la necessità di studi approfonditi che analizzino la farmacodinamica della polimixina B nella terapia di combinazione.

Sono stati condotti diversi studi per identificare una nuova alternativa ai carbapenemi o alla colistina. Tra questi, le endolisine ingegnerizzate (artilisine) sono particolarmente interessanti, nonostante gli evidenti difetti. Una nuova e promettente modalità antimicrobica è un enzima litico che degrada il peptidoglicano dei batteri, grazie alla sua modalità d'azione unica. Come gli antibiotici β-lattamici, che sono uno degli antibiotici di maggior successo, l'inibizione della sintesi del peptidoglicano è un bersaglio promettente per gli agenti antimicrobici. Poiché gli enzimi litici degradano direttamente i peptidoglicani, ma non le proteine, la possibilità che si instauri un meccanismo di resistenza è piuttosto bassa. Inoltre, gli enzimi con peso molecolare relativamente elevato non sono inibiti dalle pompe di efflusso. Mentre la breve stabilità dell'artilisina nel siero e il costo elevato della sua produzione rispetto alle piccole molecole possono essere risolti, l'artilisina migliorata può essere una buona opzione terapeutica per le infezioni da *A. baumannii* resistenti ai carbapenemi o alla colistina. In conclusione, per scoprire nuove classi di antibiotici sono necessarie strategie nuove, progettate razionalmente e approcci basati sullo screening. Se continuiamo a impegnarci per mantenere l'efficacia degli antibiotici e per sviluppare nuovi antibiotici, si potranno controllare in modo efficace le infezioni *da A. baumannii*.

9 - NON È FACILE ESSERE GREEN: UNA REVISIONE NARRATIVA SULLA MICROBIOLOGIA, LA VIRULENZA E LE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RESISTENTE AI FARMACI

Tratto e tradotto da

Behzadi P., Baráth Z., Gajdács M., *It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics 2021, 10, 42.

https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042

Abstract

Tra i batteri Gram-negativi non fermentanti, *Pseudomonas aeruginosa* è la causa più frequente di infezione; colpisce prevalentemente i pazienti immunocompromessi, ma il suo ruolo patogeno non deve essere trascurato nei pazienti immunocompetenti. Questi patogeni rappresentano una sfida terapeutica per i medici in comunità e in ospedale, a causa di una crescente prevalenza di resistenza che può portare a terapie prolungate, sequele e mortalità molto alte nella popolazione di pazienti colpiti. I meccanismi di resistenza di *P. aeruginosa* possono essere suddivisi in resistenza intrinseca e acquisita. Questi meccanismi portano alla comparsa di ceppi resistenti a importanti antibiotici, rilevanti nel trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa*, come i β-lattamici, i chinoloni, gli aminoglicosidi e la colistina. La comparsa di uno specifico resistotipo di *P. aeruginosa*, ovvero l'emergere di ceppi resistenti ai carbapenemi ma sensibili alle cefalosporine (Car-R/Ceph-S), ha ricevuto molta attenzione da parte dei microbiologi clinici e degli specialisti del controllo delle infezioni; nonostante ciò, la letteratura disponibile su questo argomento è ancora scarsa. Lo scopo di questo lavoro di revisione è quello di fornire una sintesi sull'adattabilità, la virulenza e la resistenza agli antibiotici di *P. aeruginosa* a un pubblico di scienziati e medici clinici.

9.1 INTRODUZIONE, TASSONOMIA E MICROBIOLOGIA DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

9.1.1 CONCETTI GENERALI

I batteri Gram-negativi non fermentanti (NFGNB) sono un gruppo tassonomicamente eterogeneo e popoloso di *Proteobatteri* [1]. Sebbene le caratteristiche fenotipiche di questi microrganismi possano essere variegate, la maggior parte degli NFGNB è costituita da bastoncelli aerobi obbligati, mobili (con flagelli polari o peritrichi, ad eccezione di *Burkholderia mallei*, che non è mobile) e ossidasi-positivi (che usano carboidrati semplici, ad esempio il glucosio, in modo ossidativo). Inoltre, sono tutti simili in quanto non sono in grado di fermentare gli zuccheri (da cui il nome del gruppo) per generare energia utile alle loro funzioni biologiche vitali [2,3]. Gli NFGNB comprendono alcuni generi comunemente isolati, come *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, il complesso *Burkholderia cepacia* (BCC) e *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*; tuttavia, è opportuno prendere in considerazione anche altri generi isolati con minore frequenza, come *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Brevimundas*, *Elisabethkingia*, *Flavobacterium* e *Ralstonia* [4,5,6].

9.1.2 TASSONOMIA E CARATTERISTICHE FENOTIPICHE DI *P. AERUGINOSA*

Sulla base delle caratteristiche fenotipiche, Gilardi ha classificato gli NFGNB in sette gruppi principali, mentre Palleroni ha differenziato cinque gruppi distinti di rRNA omologhi (ovvero I.: *Pseudomonas*, II.: *Burkholderia*, III.: *Comamonas*, IV.: *Brevimundas* e V.: *Stenotrophomonas*) sulla base dell'omologia rRNA-DNA [7,8]. *P. aeruginosa* è stato isolato per la prima volta da Gessard nel 1882 da pus verde, mentre il genere *Pseudomonas* è stato descritto per la prima volta da Migula nel 1894, con *P. aeruginosa* come specie tipo del genere [9]. I membri della famiglia *delle Pseudomonaceae* sono ubiquitari in natura (suolo, piante e ambienti acquatici, con serbatoi trovati in uccelli e piccoli mammiferi) [10,11,12]. *P.*

aeruginosa è la causa più comune di infezioni (sia all'interno del genere che tra le NFGNB) nell'uomo e negli animali a sangue caldo (ad esempio, infezioni del tratto urinario, mastiti ed endometriti nel bestiame e negli animali da compagnia) [13]. Altri membri del genere sono noti come patogeni dei pesci, e causano setticemia emorragica e sindrome ulcerativa [14,15]. *P. fluorescens* e *P. putida sono stati* descritti come causa di deterioramento degli alimenti refrigerati e come contaminanti nelle trasfusioni di sangue e nei preparati per infusione. *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. fulva* e *P. monteilii* sono raramente patogeni per l'uomo (descritti in pazienti con malattie allo stadio terminale e in setticemia), mentre *P. baetica*, *P. syringae*, *P. plecoglossicida* e *P. viridiflava* sono importanti patogeni vegetali [16,17,18].

P. aeruginosa è un microrganismo non fastidioso che non richiede particolari condizioni di coltivazione. Cresce bene sulla maggior parte dei terreni non selettivi (Mueller-Hinton, Nutrient agar, Luria-Bertani, agar sangue, ecc.), anche se esistono alcuni terreni utilizzati specificamente per la propagazione selettiva di *Pseudomonas* (ad esempio, cetrimide agar, King-A e King-B). Sebbene il microrganismo cresca al meglio a 37 °C, *Pseudomonas* può sopravvivere anche in un ampio intervallo di temperature (4-40 °C) [19,20]. Tra le caratteristiche fenotipiche di *P. aeruginosa*, l'odore caratteristico (descritto come simile a quello di un fiore, di "succo d'uva" o di una "tortilla fresca"), la β-emolisi (su agar sangue) e il colore delle colonie (in terreni di coltura appropriati) ne consentono una rapida identificazione organolettica [21]. *P. aeruginosa* e altri membri del genere sono noti per la produzione di vari pigmenti, tra cui la pioverdina/fluoresceina (un pigmento fluorescente giallo-verde solubile in acqua, prodotto dal 70-80% degli isolati, che agisce anche come sideroforo in condizioni di basso contenuto di ferro), la piocianina (un pigmento fenazone-derivato lipidico solubile verde-blu, con ruoli nel metabolismo del ferro, nel mantenimento dell'equilibrio redox intorno ai batteri e nella comunicazione cellula-cellula), la piorubina (un pigmento idrosolubile rosso-bruno, prodotto dal 2-3% degli isolati, con ruoli nel mantenimento dell'equilibrio redox) e la piomela-

nina/alcaptomelanina (un pigmento marrone-nero, idrosolubile e acido) [22,23,24,25] (Figura 1). È stato dimostrato che un'elevata concentrazione di fosfati nei terreni di coltura induce la produzione di pigmenti in *Pseudomonas* spp. [26,27].

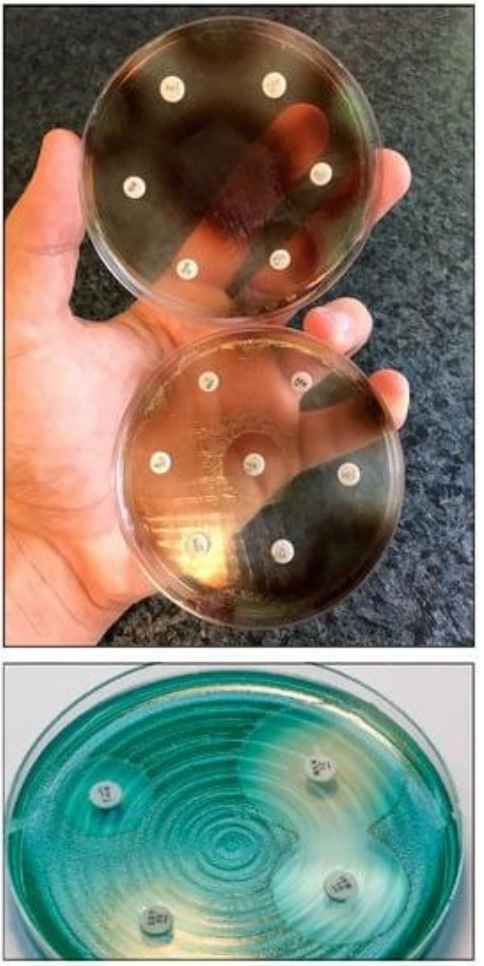


Figura 1. *Test di suscettibilità antimicrobica di P. aeruginosa mediante diffusione con disco su piastre di Mueller-Hinton agar. L'isolato nella parte superiore della figura produce piorubina e piomelanina, mentre l'isolato nella parte inferiore della figura produce piocianina.*

9.2 DETERMINANTI DI VIRULENZA DI *P. AERUGINOSA* E MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI FATTORI DI VIRULENZA

9.2.1 GENOMA DI *P. AERUGINOSA*

La patogenicità di *P. aeruginosa* è dovuta a numerosi determinanti di virulenza, alcuni dei quali sono parte integrante della sua struttura cellulare. D'altra parte, molti altri fattori di virulenza sono sintetizzati ed escreti, a seconda dell'ambiente che circonda il patogeno [28,29]. Una delle caratteristiche più importanti di *P. aeruginosa* è la sua adattabilità a diversi ambienti naturali e a condizioni difficili (in vivo), che coincide con un'elevata diversità metabolica tra le specie di questo genere [30]. La pubblicazione del primo genoma sequenziato del ceppo patogeno opportunistico *P. aeruginosa* PAO1 (isolato da una ferita) da parte di Stover et al. nel 2000 ha avuto un'importanza fondamentale nel far luce sulla fisiologia e sulle capacità di virulenza di questo patogeno [31,32]. Da allora, sono stati pubblicati i genomi completi di molte altre specie del genere (*P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* PfO-1, *P. entomophila* L48 e altri) [31,32]. Rispetto a un comune isolato Gram-negativo, l'*Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) (con un genoma di tipo "uropatogeno"). (UPEC) (con un genoma di ≥5 Mb) [33,34], *P. aeruginosa* ha un genoma di grandi dimensioni, 5,5-7 Mb, caratterizzato da una grande plasticità genomica [35,36]. Questo repertorio genetico comprende un nucleo genomico conservato di ~4 Mb, mentre il restante materiale genetico comprende vari gruppi di geni rari e isole geniche [37]. La versatilità di questo patogeno è in gran parte determinata da quest'ultimo gruppo di geni.

Il genoma di *P. aeruginosa* assomiglia a un classico genoma "secernente", con un'ampia proporzione di geni regolatori (ad esempio, pompe di efflusso e altre proteine di trasporto, motilità, chemiotassi), geni che controllano le vie metaboliche (il che consente di adattarsi a stati metabolici diversi) e geni che codificano diversi fattori di virulenza e determinanti di resistenza agli antibiotici [38,39]. Ad esempio, la fibrosi cistica - difetto

dei geni regolatori della conduttanza transmembrana (CFTR) – porta all'accumulo di succinato nei polmoni, che favorisce la colonizzazione e la sopravvivenza di *P. aeruginosa*, dato che questo microrganismo può utilizzarlo come fonte di nutrimento [40]. I fattori di virulenza e le proteasi secrete sono alcuni dei segni distintivi della patogenicità di *P. aeruginosa* e occupano circa il 3% delle strutture di lettura aperta del genoma di *P. aeruginosa* PAO1 [31,32,41]. La diversità del genoma di *P. aeruginosa* è ulteriormente aumentata dall'introduzione di elementi genetici mobili attraverso il trasferimento genico orizzontale (HGT; come trasposoni coniugativi, sequenze di inserzione e isole genomiche) [42]. *P. aeruginosa* ha anche un modo innato per aumentare la diversità genetica nei ceppi ipermutabili: il sistema di riparazione del DNA-mismatch in questi microrganismi consiste in un trimero di proteine (in particolare il trimero MutS-MutL-UvrD), che ha il ruolo di mantenere l'integrità genomica in queste specie [43,44]. È stato suggerito che le specie con mutazioni in questo sistema di riparazione danno origine a ceppi "ipermutatori", in cui il tasso di mutazione spontanea è aumentato di 1000 volte. Questi isolati sono presenti soprattutto nei polmoni dei pazienti affetti da FC e sono caratterizzati da cambiamenti fenotipici (ad esempio, il cosiddetto fenotipo "mucoide") e da un'elevata resistenza agli antibiotici [45,46].

9.2.2 FATTORI DI VIRULENZA DI *P. AERUGINOSA*

Come in altri batteri Gram-negativi, il lipopolisaccaride (LPS, o endotossina), i pili e i flagelli di tipo IV, le adesine e le lectine sono tutte parti integranti della struttura della parete cellulare esterna di *P. aeruginosa* [47,48]. In base alla catena laterale polisaccaridica O-specifica dell'LPS, è possibile differenziare 27 gruppi di antigeni, mentre esiste anche la possibilità di classificare questi batteri in base ai loro antigeni H flagellari [49]. La caratteristica della motilità di *P. aeruginosa* è riconosciuta come un vantaggio, in quanto è in grado di spostarsi da una nicchia all'altra senza difficoltà [47,48,49]. Tre tipi di motilità, tra cui

quella di sciamatura, di nuoto e di contrazione, consentono a *P. aeruginosa* di essere presente in un'ampia gamma di habitat diversi con una diversità di fattori ambientali [50]. Le lectine sono proteine presenti sulla membrana esterna di *P. aeruginosa*, che riconoscono i carboidrati glicosilati sui tessuti dell'ospite, favorendo l'adesione delle cellule batteriche. Ad esempio, LecA (che si lega al galattosio) e LecB (che si lega al fucosio) mediano l'adesione di questo patogeno alle cellule epiteliali del polmone [51,52]. Questi determinanti di virulenza cellulo-mediati hanno ruoli importanti nella fase iniziale della colonizzazione, nella persistenza e nell'instaurazione di infezioni in vivo [53]. Tuttavia, la stragrande maggioranza dei determinanti di virulenza associati a *P. aeruginosa* sono fattori secreti. Questi possono essere sintetizzati e secreti in prossimità di questi batteri (danneggiando i tessuti circostanti e le cellule immunitarie). Inoltre, possono essere introdotti direttamente nelle cellule dell'ospite attraverso un sistema di secrezione di tipo III (T3SS) [54,55,56]. I fattori di virulenza secreti sono rilevanti nelle fasi successive dell'infezione e dell'invasione, durante le quali le cellule batteriche proliferano e si verificano i conseguenti danni nelle cellule dei tessuti nel sito anatomico dell'infezione, mentre la risposta immunitaria dell'ospite viene attenuata [57].

Questi fattori di virulenza secreti in *P. aeruginosa* includono: (i) pigmenti (descritti in precedenza), siderofori (ad esempio, l'acromobactina) e composti inorganici (ad esempio, il cianuro di idrogeno), che hanno un ruolo nella rimozione del ferro, nella protezione dai danni causati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS; provenienti dalle cellule immunitarie) e nella competizione con altri generi batterici. (ii) Esotossine, comprese le citotossine effettrici come l'esotossina A (ETA), l'esotossina S (ExoS; inibisce la funzione delle cellule immunitarie innate e dei granulociti neutrofili), l'esotossina U (ExoU; attività fosfolipasica, che porta rapidamente alla lisi cellulare e ha un ruolo nell'induzione dello shock settico) e altre esotossine con funzioni simili (ExoT: inibisce la divisione cellulare nelle cellule di mammifero e influisce sui processi di guarigione delle ferite, ExoY: indu-

ce processi pro-apoptotici, ed esolisina A (ExlA), secreta da un sistema di secrezione a due partner (TPS)). (iii) Proteasi e altri enzimi: lipasi, proteasi alcaline, elastasi A (LasA) e B (LasB), emolisi termostabile/fosfolipasi H (PLH), fosfolipasi C (PLC) e DNasi. (iv) Sistemi di secrezione: *P. aeruginosa* è nota per avere 5 tipi di sistemi di secrezione, tra cui i tipi I (T1SS), II (T2SS) e III sono coinvolti nella virulenza di questo patogeno. T1SS e T2SS sono rilevanti per la secrezione di varie proteasi e lipasi, ETA, LasA, LasB e PLH. D'altra parte, esistono due distinti T3SS in *P. aeruginosa*: il ruolo di fT3SS è quello di espellere le proteine flagellari (per favorire la motilità e possono anche avere un ruolo nella formazione del biofilm), mentre la iT3SS è una proteina simile a un ago ("iniettasoma"), che introduce le tossine effettrici precedentemente menzionate (come ExoU ed ExoS) nel citoplasma delle cellule di mammifero [42,54,55,56,57,58, 59,60,61,62,63]. (v) Biofilm (vedi sezione 2.4). A differenza dei fattori di virulenza mediati dalle cellule (che sono considerati costitutivi), la produzione di fattori di virulenza secreti dipende in larga misura dai fattori ambientali e dalla nicchia che circonda il patogeno.

9.2.3 METODI DI TIPIZZAZIONE PER LA DIFFERENZIAZIONE DEI CLONI DI *P. AERUGINOSA*, DIFFUSIONE GLOBALE

Sono stati proposti molti metodi (con costi, intensità di lavoro e potere discriminatorio diversi) per la valutazione della somiglianza genetica di *P. aeruginosa*, che sono altrettanto importanti per gli interventi di controllo delle infezioni locali e per il controllo dei focolai, oltre che per la valutazione di cloni nazionali o globali di successo da parte della microbiologia della sanità pubblica [64,65]. Tra questi metodi possiamo annoverare la sierotipizzazione, la tipizzazione fagica (basata sulla sensibilità differenziale di questi isolati ai batteriofagi standardizzati), la tipizzazione piocinica, l'elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE), l'elettroforesi su gel a inversione di campo (FIGE), la reazione a catena della polimorfosi del DNA amplificata in modo casuale

(RAPD-PCR), i microarray oligonucleotidici, la tipizzazione di sequenze multilocali (MLST) e il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) [66,67,68]. Mentre gli ultimi tre metodi sono rilevanti per l'identificazione di cloni di *P. aeruginosa* di successo a livello internazionale, gli altri metodi di tipizzazione elencati sono utilizzati nella valutazione di focolai locali. Attualmente sono stati identificati tre principali cloni internazionali multiresistenti (MDR), che hanno mostrato la maggiore diffusione a livello mondiale, ovvero i cloni ST111, ST175 e ST235 [69,70]. L'ST111 (caratterizzato dal sierotipo O12) e l'ST235 (caratterizzato dal sierotipo O11) sono stati descritti in quasi tutti i continenti del mondo, mentre l'ST175 (caratterizzato dal sierotipo O4) è stato rilevato solo nei Paesi europei [69,70].

I cloni ST235 sono noti come altamente virulenti, per via della presenza di ExoU in questi ceppi, e questi isolati sono MDR; pertanto, anche la terapia per queste infezioni è notevolmente più difficile. In generale, si può affermare che la continua espressione di determinanti di resistenza ostacola la virulenza del microrganismo; tuttavia, il carico di fitness associato al mantenimento del fenotipo MDR è risultato inferiore nel caso dei cloni ST235 [71]. Sulla base dell'analisi WGS, gli isolati di *P. aeruginosa* di origine clinica e ambientale possono essere raggruppati in tre distinti resistotipi, ovvero PAO1, PA14 e PA7. PAO1 e PA14 sono caratterizzati dal sistema di secrezione T3SS e delle corrispondenti tossine effettrici (ExoS ma non ExoU nel caso di PAO1, ed ExoU ma non ExoS nel caso di PA14). I PA7, invece, non possiedono la T3SS, ma utilizzano la TPS, con la quale secernono l'esolisina ExlA per danneggiare le cellule dei tessuti circostanti [72]. Alcuni rapporti suggeriscono che potrebbe esistere un'associazione tra virulenza e resistenza agli antibiotici negli isolati di *P. aeruginosa*, poiché è stato dimostrato che il trasporto dei geni exoU è correlato alla resistenza agli aminoglicosidi e ai fluorochinoloni. Una possibile spiegazione è che l'isola genomica che trasporta exoU possa contenere anche geni determinanti per la resistenza [73,74].

9.2.4 FORMAZIONE DEL BIOFILM

Senza dubbio, uno dei più importanti determinanti di virulenza nella patogenesi delle infezioni da *P. aeruginosa* è la produzione di un biofilm. Il biofilm consente l'adesione di questi patogeni su varie superfici, fornisce una protezione dalle condizioni ambientali difficili (ad esempio sforzo di taglio ed essiccazione) e dal sistema immunitario dell'ospite (ad esempio, cellule natural killer, fagociti, complemento, danni mediati da ROS) [75,76,77]. I biofilm hanno composizioni eterogenee, costituite da aggregati di comunità batteriche sessili (in base alla loro composizione, può trattarsi di biofilm monospecie o multispecie), esopolisaccaridi (EPS; ad esempio, alginato, cellulosa, destrano, ramnolipidi), DNA ambientale (eDNA), carboidrati, proteine, tensioattivi, lipidi, vari ioni e acqua [78,79]. La modalità di crescita dei biofilm è stata descritta per la prima volta negli anni '30, mentre la reale importanza dei batteri incorporati nei biofilm nei processi infettivi è stata compresa solo negli ultimi decenni [80,81]. Le cellule batteriche di solito si attaccano a superfici idrofobiche e/o ruvide con l'aiuto dei loro determinanti di virulenza cellulo-mediati (ad esempio, pili, fimbrie, antigeni di superficie), cui segue la produzione dell'EPS protettivo e di altri componenti [82]. Il biofilm permette a *P. aeruginosa* di persistere nell'ambiente esterno (in tubature e serbatoi dell'acqua, lavandini, sulle piastrelle degli ospedali, su apparecchiature mediche, come ventilatori meccanici e tubi respiratori, umidificatori, apparecchiature per la dialisi e cateteri, endoscopi e dispositivi medici impiantati, in preparazioni mediche, come soluzioni per irrigazione, liquido per dialisi, liquido per lenti a contatto, soluzione antisettica, creme) e in vivo [75,76,77,78,79,83,84].

La formazione di biofilm è un attributo chiave per il successo di *P. aeruginosa* come patogeno nosocomiale ed è anche un importante segno distintivo della persistenza batterica cronica. Ciò può essere osservato nelle carie dentali sulle superfici dei denti [85,86], nelle infezioni della pelle e dei tessuti molli [52], nelle infezioni dell'orecchio medio [87], nelle infezioni associate

a cateteri [19], nelle polmoniti e nei polmoni dei pazienti con FC [88]. In quest'ultimo caso, *P. aeruginosa* è in grado di sopravvivere ed evitare la clearance (resistendo alla risposta immunitaria e alla successiva somministrazione di antimicrobici) nella zona respiratoria e conduttiva dei polmoni [89,90]. Ad esempio, l'alginato e altri polisaccaridi prodotti dalle varianti mucoidi sono efficaci nello scavenging dei ROS, dove proteggono le cellule batteriche [91]. Oltre alla protezione dalle cellule immunitarie, il biofilm fornisce ai microrganismi un rifugio sicuro contro gli antibiotici in vivo, contribuendo al fenotipo MDR. In diverse pubblicazioni è stato osservato che le concentrazioni minime inibitorie (MIC) dei batteri all'interno del biofilm possono essere 10-10.000 volte più alte rispetto alle cellule planctoniche [75,76,77,78,79,83,84,88,89,90]. Da un lato, la matrice extracellulare secreta ostacola significativamente la diffusione delle molecole antibiotiche per raggiungere efficacemente i bersagli batterici (barriera farmacocinetica); dall'altro, i batteri che risiedono negli strati più profondi del biofilm si adattano a uno stato metabolico differenziato [75,76,77,78,79,83,84,88,89,90]. Va notato che l'inibizione della crescita batterica è meccanicamente distinta dall'uccisione dei batteri e gli antimicrobici (anche in dosi efficaci) potrebbero non uccidere le cellule all'interno di un biofilm. A causa dell'alta densità batterica, della bassa tensione di ossigeno e della mancanza di nutrienti, i batteri diventano dormienti e utilizzano vie metaboliche alternative [91].

Oltre a mancare di motilità cellulare, queste cellule "persistenti" (definite anche *small-colony variants* (SCVs)) corrispondono a una variante fenotipica transitoria dei batteri, che non sono geneticamente resistenti agli antibiotici, ma che nelle condizioni sopra citate possono tollerare concentrazioni molto elevate di questi farmaci (barriera farmacodinamica) [92,93,94,95]. In sostanza, i persistenti (che corrispondono all'1-2% della popolazione batterica) scelgono di non proliferare durante l'esposizione agli antibiotici, ma riprendono a replicarsi se i fattori di stress vengono rimossi dall'ambiente [92,93,94,95]. I persistenti possono anche essere importanti nella ricorrenza e nella cronicizza-

zione delle infezioni da *P. aeruginosa*. Sebbene le conoscenze sui meccanismi che portano alla formazione di cellule dormienti/persistenti siano scarse, è stato suggerito che potrebbero essere coinvolti i sistemi di secrezione [96]. La terapia delle infezioni da biofilm è una sfida importante, poiché attualmente non esiste una terapia mirata in grado di eradicare completamente i biofilm in vivo. Tuttavia, diversi composti (ad esempio, anioni polivalenti, DNasi come la dornasi-α e l'alginato liasi) possono essere utili per ridurre la densità del muco [97]. D'altra parte (anche se le prove su questo argomento sono ancora controverse), alcuni esperimenti hanno dimostrato che concentrazioni sub-MIC di alcuni antibiotici (soprattutto β-lattamici, tra cui ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem) possono avere l'effetto opposto, inducendo la produzione di biofilm [98,99,100]. *P. aeruginosa* mostra anche la capacità di tollerare biocidi (ad esempio, antisettici e disinfettanti) come la clorexidina o il triclosan, mediata dal gene *fabV*, che codifica per una proteina enoil-acil-carrier resistente al triclosan. La mancanza di sensibilità ai biocidi ostacola ulteriormente il successo dell'eliminazione di *P. aeruginosa* dagli ambienti ospedalieri [101,102].

9.2.5 CONTROLLO MEDIATO DAL QUORUM SENSING (QS) DELL'ESPRESSIONE DEI FATTORI DI VIRULENZA IN *P. AERUGINOSA*

Per consentire il continuo adattamento di *P. aeruginosa* alle diverse nicchie ambientali e ai diversi stadi dell'infezione, è necessario che la secrezione dei suddetti fattori di virulenza sia strettamente regolata. Una delle regolazioni più importanti in *P. aeruginosa* è rappresentata dai suoi sistemi di quorum sensing (QS) [103]. Il QS è una sorta di "comportamento sociale" dei batteri; qui, piccole molecole di segnale (definite autoinduttori) vengono utilizzate per influenzare l'espressione genica nelle cellule batteriche, in modo dipendente dalla densità e da cellula a cellula [104,105]. Se la densità della popolazione batterica (e quindi la concentrazione di queste molecole segnale) raggiunge una certa soglia, si verificano dei cambiamenti nella fisiologia

batterica per favorire i comportamenti collettivi o per aiutare i microrganismi a superare altri microrganismi nella nicchia ecologica (ad esempio, secernendo fattori di virulenza o composti antibatterici) [106,107].

Quattro sistemi interconnessi, ovvero le vie *iqs*, *las*, *pqs* e *rhl*, compongono la rete di regolazione QS delle specie di *Pseudomonas*. In questa rete, vari autoinduttori (come gli acil-omoserina lattoni (acil-HSL), come il butanoil omoserina lattone (C4 HSL) e il 3-oxodecanoil omoserina lattone (C12 HSL)), la molecola di acido grasso complesso di *B. cepacia, la* molecola di acidi grassi complessi denominata fattore di segnale in grado di essere diffuso (BDSF [*Diffusible Signal Factor*]), gli autoinduttori di tipo oligopeptidico (come l'autoinduttore-2 (AI-2)), la molecola di segnale dei chinoloni di *Pseudomonas* (PQS) e la molecola di segnale QS integrata (IQS)). La descrizione dettagliata di queste molecole segnale esula dallo scopo di questa revisione (per i dettagli, si vedano [103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113]). Inoltre, queste molecole autoinduttrici sono in grado di attenuare la risposta immunitaria innata e di indurre citochine e chemochine [114].

Poiché la produzione di biofilm e la secrezione di altri fattori di virulenza sono tutti regolati dal complesso sistema QS di *P. aeruginosa*, questi hanno un'influenza significativa sulla virulenza. Il QS media l'espressione dei suoi pigmenti, della proteasi alcalina, dell'emolisina, dell'elastasi, delle lectine, delle esotossine effettrici, dell'esotossina A, dei movimenti di nuoto e di contrazione, dell'attività del T1SS e del T2SS (l'attività del T3SS è influenzata dal QS in misura minore), della produzione di biofilm e dell'acido cianidrico, tra gli altri [115,116]. Il QS è anche un importante mediatore della reciprocità tra virulenza batterica, resistenza agli antibiotici e fitness microbica [117]. La complessità della patogenicità di *P. aeruginosa* è rappresentata nella Figura 2.

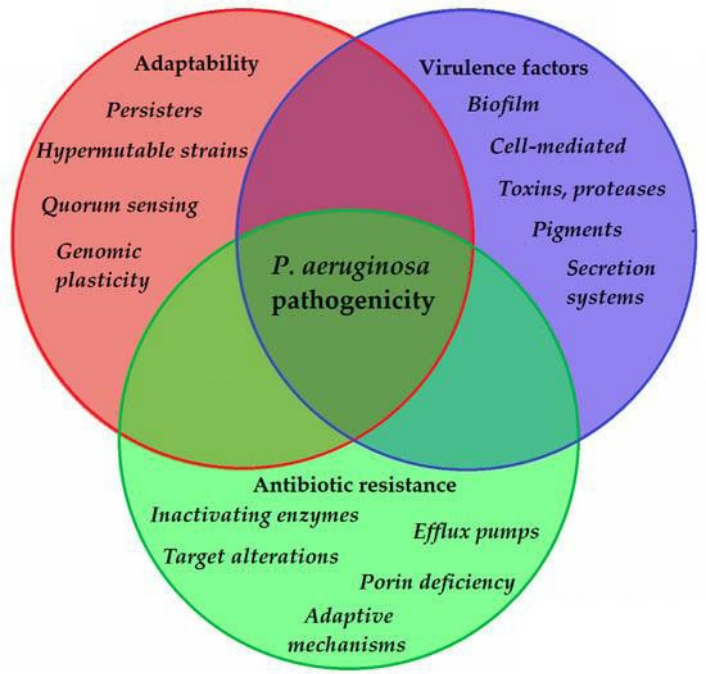


Figura 2. *Componenti principali della patogenicità di P. aeruginosa.*

Tuttavia, è noto che il mantenimento di molti determinanti di resistenza e fattori di virulenza può comportare elevati costi di fitness, portando i ceppi più suscettibili a superare quelli MDR [103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,116,117].

Al contrario, dosi terapeutiche e sub-inibitorie di antibiotici (ad esempio, ceftazidime, cefepime, imipenem, fluorochinoloni, doxiciclina) possono eliminare varie molecole di segnale del QS o inibire il loro legame ai relativi recettori, sopprimendo così la loro virulenza [118,119]. Oltre al QS, la produzione di biofilm è mediata anche da vari sistemi di regolazione a due componenti (GacS/GacA, RetS/LadS) e dal diguanilato ciclico (di-GMP ciclico: un guanosina monofosfato dimerico ciclico), con la molecola segnale che ha un ruolo critico nella secrezione di EPS [120]. Se questi batteri aderiscono a qualsiasi superficie in vivo o inani-

mata, la concentrazione di di-GMP ciclico aumenta, portando all'espressione di determinanti "statici", come i pili adesivi (che assicurano l'attaccamento alla superficie) e alla conseguente produzione di biofilm. Allo stesso tempo, l'aumento del di-GMP ciclico determina anche la repressione della sintesi e della funzione dei flagelli (determinanti della "motilità") [120,121]. Questo porta all'ispessimento del biofilm iniziale, che corrisponde a una protezione contro le cellule immunitarie e gli antimicrobici.

9.2.6 RILEVANZA CLINICA DI *P. AERUGINOSA*

Come descritto in precedenza, *P. aeruginosa* ha i mezzi per migrare, eludere le risposte immunitarie dell'ospite e gli agenti antimicrobici nocivi, produrre tossine ed esoenzimi per danneggiare le cellule dell'ospite e adattarsi con successo a qualsiasi ambiente [122]. Considerando le caratteristiche epidemiologiche globali degli NFGNB, *P. aeruginosa* è la causa più frequente di infezioni [123,124]. Anche se le pseudomonadi possiedono diversi fattori di virulenza, se paragonate ai membri dell'ordine *Enterobacterales* o ad altri batteri più comunemente considerati patogeni (ad esempio, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*), non sono considerate altamente patogene. Ciononostante, possono essere responsabili di un'ampia gamma di manifestazioni patologiche, che spesso si presentano manifestano come infezioni croniche e difficili da debellare [125,126]. Per *P. aeruginosa* sono comuni anche le infezioni multisito. Le persone colpite sono più comunemente pazienti immunocompromessi (affetti da altre malattie o condizioni di base, vedi Tabella 1), ma il suo ruolo patogeno non dovrebbe essere trascurato nei pazienti immunocompetenti [125,126,127,128,129,130]. *P. aeruginosa* è considerato principalmente un patogeno Gram-negativo opportunistico e nosocomiale (responsabile del 13-19% delle infezioni nosocomiali negli Stati Uniti), che si trova comunemente nelle unità di terapia intensiva (ICU) e nelle sale chirurgiche, dove l'ampio uso di antimicrobici ha permesso la selezione di questi microrganismi [131]. Praticamente tutte le istituzioni sanitarie hanno riportato focolai

di *P. aeruginosa* e infezioni intraospedaliere, poiché questi batteri hanno la capacità di persistere su diverse superfici inanimate e di diffondersi tramite aerosol [132]. In circostanze normali, *P. aeruginosa* può colonizzare solo transitoriamente il tratto intestinale (anche se questo tasso può aumentare se il paziente è immunocompromesso). Ciononostante, l'8-20% delle infezioni nosocomiali e delle epidemie sono associate a individui con colonizzazione [125]. Per evitare i focolai nosocomiali, è fondamentale la stretta osservanza dei protocolli di controllo delle infezioni, dei piani di pulizia ambientale e delle pratiche di igiene delle mani, oltre all'identificazione e all'eliminazione dei possibili serbatoi di infezione [125].

Ricovero ospedaliero
Ventilazione meccanica
Immunodeficienze innate o acquisite (neutropenia, virus dell'immunodeficienza umana [HIV]/sindrome dell'immunodeficienza acquisita [AIDS], neoplasie)
Procedure mediche invasive (interventi chirurgici, trapianti)
Cateterismo (urinario, venoso centrale)
Ustioni, lesioni esterne gravi
Terapia immunosoppressiva
Chemioterapia del cancro
Radioterapia
Malattie del sistema cardiovascolare
Malattie dell'apparato respiratorio (ad es. broncopneumopatia cronica ostruttiva, fibrosi cistica)
Diabete mellito
Pazienti che vivono in condizioni di vita disagiate, malnutrizione
Uso di droghe per via endovenosa

Tabella 1. *Principali fattori di rischio per l'acquisizione di infezioni da P. aeruginosa [125,126,127,128,129,130].*

Tra le possibili manifestazioni cliniche abbiamo la polmonite (principalmente associata al ventilatore (VAP; 10-30%), mentre

la forma acquisita in comunità è molto meno comune (CAP; 1-3%)), le infezioni della pelle e dei tessuti molli associate a ustioni e interventi chirurgici (8-10%), la follicolite da "vasca calda", l'otite esterna da "orecchio del nuotatore", le infezioni oculari (cheratite), le infezioni delle vie urinarie (UTI; 813.8615%), l'endocardite e la batteriemia/sepsi (associata in modo primario o spesso secondario alla polmonite) [125,126,127,128,129,130,133]. Tra i patogeni batterici responsabili della cheratite associata alle lenti a contatto, *P. aeruginosa* è quello che presenta la manifestazione peggiore (cioè lo sviluppo di un'ulcera corneale, che può verificarsi nel 40-60% dei casi), con esiti sfavorevoli, distruzione fulminante della cornea e perdita della vista [73,134,135]. Il tasso di mortalità delle infezioni da *pseudomonas* è una grande preoccupazione tra i pazienti immunocompromessi e ospedalizzati, e si aggira intorno al 25-39% per la polmonite e al 18-61% per la batteriemia, mentre questi tassi possono essere più elevati (40-70%) in caso di isolati MDR [136,137,138]. In alcuni gruppi di età, queste infezioni possono avere manifestazioni particolarmente gravi (ad esempio, polmonite nosocomiale negli anziani e sepsi e meningite gravi nei neonati) [125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137]. Gli esiti sfavorevoli associati a queste infezioni corrispondono alle gravi condizioni di questi pazienti e ai fattori di virulenza di questo patogeno. *P. aeruginosa* è anche un fattore importante nella progressione dei disturbi respiratori cronici; ad esempio, una revisione sistematica ha rilevato un aumento del tasso di ospedalizzazione, un tasso di esacerbazioni più elevato, una peggiore qualità della vita e un aumento di 3 volte del rischio di mortalità nei pazienti con bronchiectasie positive per *P. aeruginosa* nei polmoni [139]. È stato inoltre riscontrato che *P. aeruginosa* è indotta dal fumo di sigaretta, il che ha portato all'emergere di un fenotipo *nfx*C resistente ai farmaci [140].

P. aeruginosa è l'agente patogeno più comune e più studiato in ambito FC. La prima esposizione a *Pseudomonas* può essere legata a una precedente infezione virale (che limita ulteriormente le difese nei polmoni dell'ospite) e i batteri di solito provengono da qualche fonte naturale (per esempio, aerosol, acqua,

flora batterica di altri individui) [141]. I ceppi di *P. aeruginosa* che si insediano nei polmoni dei pazienti affetti da FC non sono inizialmente di tipo mucoide; tuttavia, a distanza di 3-6 mesi vengono isolati ceppi con una superficie altamente viscida e un fenotipo mucoide [142]. Nei pazienti affetti da FC, *P. aeruginosa* può essere eradicato solo nelle prime fasi della colonizzazione (il che fornisce una "finestra di opportunità" per un trattamento antibiotico aggressivo precoce), mentre durante la colonizzazione cronica o le esacerbazioni nelle ultime fasi della vita, l'obiettivo è ridurre il numero di batteri [141,142]. È stato dimostrato che l'età della prima positività per *P. aeruginosa* è un importante fattore determinante del decorso della malattia nei soggetti affetti da FC.

La prevalenza del patogeno tra 0 e 5 anni di età è del 10-30%, mentre oltre i 25 anni è presente in >80% dei pazienti e queste infezioni polmonari croniche raramente vengono eradicate completamente. *P. aeruginosa* è uno dei fattori più importanti delle esacerbazioni polmonari fatali nei pazienti con FC [142]. La *P. aeruginosa* è anche un patogeno degno di nota nell'allevamento degli animali, che rappresenta una causa considerevole di perdite economiche e di difficoltà nel mantenere un numero di animali sufficiente per la commercializzazione (vedi sezione 1.2) [13,14,15,16,17,18,143].

9.3 RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN P. AERUGINOSA: ALTERNATIVE TERAPEUTICHE

9.3.1 CONCETTI GENERALI RELATIVI AGLI AGENTI PATOGENI MDR

In generale, la terapia delle infezioni causate da NFGNB rappresenta una sfida terapeutica interessante per i medici sia in ambito comunitario che ospedaliero, a causa della crescente prevalenza di isolati resistenti, che mostrano resistenza a diverse classi di antibiotici [144]. Al giorno d'oggi la comparsa di isolati classificati come MDR, resistenti ai farmaci estesi (XDR) e per-

sino pandrug-resistenti (PDR, o totalmente resistenti ai farmaci (TDR [*Total-Drug Resistant*]), definiti dalle raccomandazioni della Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive; ESCMID [145]), sta diventando comune nella pratica clinica. L'onere dei batteri MDR e i rischi associati per l'uomo sono stati evidenziati da molti organismi nazionali e internazionali (ad es, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [146], il Centro Europeo per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie (ECDC) [147], il Servizio Sanitario Nazionale (NHS) del Regno Unito [148] e i Centri statunitensi per il Controllo delle Malattie (CDC) [149]); è stato sottolineato che, senza la disponibilità di una terapia adeguata, queste infezioni comportano un'ospedalizzazione prolungata, la riduzione della qualità della vita (QoL), delle sequele e un eccesso di mortalità nelle popolazioni di pazienti colpite.

In molti casi, il cattivo esito clinico è chiaramente associato alle infezioni causate da patogeni MDR, rispetto alle loro controparti sensibili [150]. Le due principali forze trainanti del problema clinico della resistenza agli antibiotici sono l'uso indiscriminato di questi ultimi in indicazioni inappropriate, oltre alla diminuzione dell'interesse delle aziende farmaceutiche a impegnarsi nella ricerca antimicrobica [151].

Sebbene il problema della MDR sia stato osservato per la prima volta nelle infezioni nosocomiali, oggi non è raro contrarre un'infezione con un patogeno MDR in comunità [152]. Il Burden of Antimicrobial Resistance Collaborative Group ha stimato che solo nel 2015, nell'Unione Europea e nell'Area Economica Europea, sono state descritte oltre 700.000 infezioni MDR, 33.110 morti in eccesso e circa 875.000 anni di vita aggiustati per disabilità (DALY) [153].

Gli organismi MDR minacciano anche il progresso degli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (SDGs) fissati dalle Nazioni Unite per il 2030, con effetti più gravi nei Paesi in via di sviluppo [154]. *P. aeruginosa* – insieme ad altri NFGNB – fa parte dei cosiddetti patogeni "ESKAPE" (E: *Enterococcus faecium*, S: *S. aureus* o recentemente *S. maltophilia*, K: *Klebsiella pneumoniae* o

recentemente C: *Clostridioides difficile*, A: *A. baumannii*, P: *P. aeruginosa*, E: *Enterobacter* spp, o recentemente *Enterobacteriaceae*): l'acronimo comprende i batteri più preoccupanti dal punto di vista clinico e della salute pubblica [155]. Ciò è stato sottolineato dal rapporto pubblicato dall'OMS, in cui sono stati indicati come patogeni critici prioritari *P. aeruginosa* resistente ai carbapenemi, *A. baumannii* complex resistente ai carbapenemi e membri delle Enterobacterales resistenti ai carbapenemi o produttori di ESBL [156]. Le segnalazioni più preoccupanti nella letteratura internazionale riguardano *Acinetobacter* spp. MDR; tuttavia, a causa della sua incidenza molto più elevata, la rilevanza di *P. aeruginosa* è più alta [157]. Recentemente, è stato descritto un ceppo PDR di *Pseudomonas* sp. in grado di utilizzare l'ampicillina come unica fonte di carbonio [158].

9.3.2 RESISTENZA INTRINSECA E PRINCIPALI ALTERNATIVE TERAPEUTICHE NELLE INFEZIONI DA *P. AERUGINOSA*

La terapia delle infezioni da *Pseudomonas* si basa in larga misura su un numero limitato di antibiotici e su alcuni nuovi agenti recentemente commercializzati, rilevanti in caso di resistenza estesa (Tabella 2) [159,160]. Le modalità di resistenza agli antibiotici in *P. aeruginosa* possono essere classificate in tre categorie, tra cui (i) adattativa (formazione di biofilm, forme quiescenti), (ii) intrinseca (vedi Tabella 2) e (iii) meccanismi di resistenza acquisita (mutazione o acquisizione di integroni, plasmidi, pro-fagi e trasposoni per mezzo di HGT), con il risultato di un resistoma ricco e diversificato [161].

L'insorgenza di mutazioni può portare a una riduzione dell'assorbimento degli antibiotici, a modifiche del bersaglio degli antibiotici e alla sovraespressione di pompe di efflusso e di enzimi inattivanti gli antibiotici [162,163,164]. In sostanza, ad eccezione dei fluorochinoloni (che presentano un'eccellente biodisponibilità orale), tutte le attuali alternative terapeutiche per *P. aeruginosa* devono essere somministrate per via parenterale [165]. Clinicamente, le infezioni causate da *Pseudomonas* spp. sono più

frequentemente trattate con antibiotici β-lattamici: questi farmaci dovrebbero essere considerati la spina dorsale della terapia antinfettiva, soprattutto in caso di gruppi di pazienti particolari (cioè neonati, bambini piccoli, donne in gravidanza e anziani). In questi pazienti, l'uso di altri farmaci ausiliari è controindicato, a causa dei loro eventi avversi (neurotossicità e nefrotossicità per gli aminoglicosidi e la colistina, e tendinite, rottura dei tendini, fotosensibilità ed epatotossicità per i fluorochinoloni) o della loro teratogenicità [166,167].

Se i livelli di resistenza diventano sempre più avanzati (o in caso di ipersensibilità ai β-lattamici), possono essere necessari regimi antibiotici di ultima istanza, che corrispondono a eventi avversi più gravi e a una diminuzione della qualità di vita (QoL) dei pazienti affetti [168]. La nefrotossicità è un problema critico nei pazienti sottoposti a trapianto, che ricevono molti altri farmaci che agiscono sui reni [136]. In effetti, un nuovo metodo di classificazione della resistenza batterica, denominato resistenza difficile da trattare (DTR), prende in considerazione l'utilità clinica e il rapporto rischio/beneficio degli antibiotici nel trattamento delle infezioni da Gram-negativi.

Sulla base di questo criterio, gli isolati di *Pseudomonas* resistenti alle cefalosporine ad ampio spettro, ai carbapenemi e ai chinoloni sono definiti DTR [169,170]. Tra i fattori di rischio per l'acquisizione di *P. aeruginosa* MDR vi sono il ricovero in un'unità di terapia intensiva (ICU), una previa degenza ospedaliera e l'uso precedente di vari gruppi di antibiotici (chinoloni, cefalosporine, carbapenemi) [171,172].

È interessante notare che le proteasi e le elastasi (due importanti fattori di virulenza per lo sviluppo di malattie gravi e invasive) sono anche le più comuni negli isolati provenienti dalle unità di terapia intensiva [173].

Antibiotici a cui le specie di Pseudomonas sono intrinsecamente resistenti	Antibiotici rilevanti nella terapia delle infezioni da Pseudomonas
Glicopeptidi (ad esempio, vancomicina)	Antibiotici β-lattamici: cefalosporine di terza e quarta generazione a somministrazione parenterale (ceftazidime, cefepime, piperacillina/tazobactam), monobattami (aztreonam), carbapenemi (imipenem, meropenem e doripenem), nuove combinazioni di β-lattamici/β-lattamasi (ceftolozane/tazobactam, ceftazidime/avibactam, imipenem/cilastatina/relebactam, meropenem/vaborbactam)
Daptomicina	
Ossazolidinoni (ad es. linezolid)	
Macrolidi (ad es. azitromicina)	
Lincosamidi (ad esempio, clindamicina)	
Streptogramine (ad esempio, quinupristina-dalfopristina)	
Rifampicina	
Trimetoprim-sulfametossazolo	Fluorochinoloni: ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, delafloxacina
Tetraciclina	
Aminopenicilline	Aminoglicosidi, neoglicosidi: gentamicina, tobramicina, amikacina, plazomicina
Combinazioni di aminopenicillina/β-lattamasi-inibitori	
Cefalosporine di I-II generazione	Polimixine: colistina
Cefalosporine di III generazione somministrate per via orale	

Tabella 2. *Resistenza intrinseca e alternative terapeutiche rilevanti nelle infezioni da Pseudomonas [159,160,161,162,163,164,165].*

Attualmente, le strategie di dosaggio degli antibiotici (in quanto vengono dosati principalmente con l'obiettivo di curare) facilitano l'emergere di sottopopolazioni mutanti resistenti nei batteri; pertanto, è necessario un cambiamento nell'approccio clinico per spostare l'endpoint della terapia verso l'uccisione e la soppressione della resistenza (che è meccanicamente diversa dall'inibizione della crescita) [174,175]. Per ottenere questo risultato, sono necessari degli agenti che uccidono rapidamente questi microrganismi in dosi sufficientemente elevate, il che si traduce anche in una cura clinica [174,175].

9.3.3 PRINCIPALI MECCANISMI DI RESISTENZA DI *P. AERUGINOSA* AGLI ANTIBIOTICI DIVERSI DAI β-LATTAMICI

La parete cellulare dei Gram-negativi è un complesso costrutto di anatomia batterica (che comprende il bilayer asimmetrico di fosfolipidi, proteine leganti la penicillina (PBPs), porine (o proteine della membrana esterna (OMPs)) e altri tipi di canali proteici, LPS e varie pompe di efflusso), che agisce come una barriera selettiva da penetrare o aggirare per consentire alle molecole antibiotiche di esercitare le loro attività farmacologiche sui loro bersagli molecolari [176]. La permeabilità della membrana esterna di *P. aeruginosa* è limitata (10-150× inferiore a quella di *E. coli*), il che porta alla non suscettibilità intrinseca a molti agenti precedentemente elencati (insieme al loro efflusso). Inoltre, qualsiasi modifica ai costituenti della struttura della parete cellulare influisce inevitabilmente sulla suscettibilità agli antibiotici [177,178]. Le porine di *P. aeruginosa* (proteine a barile β che si ripiegano all'interno della membrana esterna composte da foglietti β anti-paralleli) sono classificate in porine non specifiche (OprF), specifiche (OprB, OprD o la porina D2, OprE, OprO, OprP), gated (OprC, OprH) e di efflusso (OprM, OprN, OprJ) [179]. Tra le diverse porine di *P. aeruginosa*, OprF è la non-lipoproteina più comune all'interno della membrana esterna (la porina omologa di *E. coli* è OmpA), coinvolta nel garantire l'integrità della membrana esterna, il QS, la formazione di biofilm, l'adesione batterica e le infezioni acute e croniche [179,180]. Gli antibiotici β-lattamici e i fluorochinoloni entrano nelle cellule batteriche attraverso i suddetti canali porinici, gli aminoglicosidi sono assorbiti attraverso un processo a due fasi, che prevede la presenza di catene di trasporto di elettroni dipendenti dall'ossigeno o dall'azoto, mentre la colistina facilita il proprio assorbimento interagendo con l'LPS dei Gram-negativi [176,177,178,179,180]. L'assenza di ossigeno (ad esempio, nelle profondità di un biofilm o nei batteri anaerobi) o la carenza funzionale delle ATPasi può portare alla resistenza agli aminoglicosidi [181]. La porina più importante nel contesto dell'assorbimento degli antibiotici è la

porina OprD, una proteina di 54 kDa. La perdita della porina OprD (solitamente mediata dall'inattivazione del gene OprD attraverso delezioni, mutazioni o inserzioni) è stata segnalata come uno dei principali meccanismi di resistenza ai carbapenemi in *Pseudomonas* [182]; inoltre, l'imipenem seleziona i mutanti porino-deficienti in 1 paziente su 5 trattati con questo farmaco [183]. D'altra parte, la sovrapproduzione della porina OprH (che è la più piccola porina di *P. aeruginosa*), associata alla starvazione dei cationi, è stata descritta in isolati con un aumento delle MIC alle polimixine e agli aminoglicosidi [184].

L'iperespressione delle pompe di efflusso è un fattore ben noto che contribuisce al fenotipo MDR, in quanto può interessare molti gruppi diversi di antibiotici contemporaneamente [185]. In base alla loro struttura proteica, questi sistemi di efflusso possono essere classificati in cinque superfamiglie, tra cui la superfamiglia ATP-*binding cassette* (ABC), la famiglia MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*), la superfamiglia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), la famiglia RND (*resistance-nodulation-division*) e la famiglia SMR (*small multidrug resistance*). D'altra parte, possono anche essere suddivise in pompe dipendenti dall'idrolizzazione dell'ATP per estrudere composti rilevanti o dall'utilizzo della forza motrice protonica (PMF) [186,187]. Dal punto di vista della resistenza agli antibiotici negli *Pseudomonas*, i membri della superfamiglia RND sono i più importanti. Finora sono state descritte dodici pompe RND, di cui le quattro con sovraespressione (mediata da mutazioni nei geni *nalB*, *nfxB* e *nfx*C) contribuiscono in modo significativo con profili di substrato diversi (MexAB-OprM: β-lattami e chinoloni, MexCD-OprJ: β-lattami, MexEF-OprN: chinoloni e MexXY-OprM: aminoglicosidi) [186]. La resistenza mediata dalla pompa di efflusso di solito conferisce una resistenza di basso livello agli antibiotici rilevanti, che a sua volta porterà a una resistenza clinicamente rilevante, se combinata con qualche altro meccanismo di resistenza [176,185,186,187,188]. Va notato che i suddetti meccanismi di resistenza possono influenzare in modo diverso la suscettibilità in vitro di *P. aeruginosa* a singoli antibiotici (anche del gruppo

farmacologico): nei laboratori di microbiologia clinica, si osserva spesso che alcuni isolati sono resistenti al meropenem, ma non all'imipenem, o resistenti all'amikacina, ma non alla tobramicina [189]. Oltre alla sovraespressione della pompa di efflusso, le mutazioni nei geni target che codificano per la DNA girasi (*gyrA*, *gyrB*) e la topoisomerasi IV (*parC*, *parE*) nella regione di determinazione della resistenza ai chinoloni (QRDR) sono il meccanismo più importante di resistenza ai fluorochinoloni, che porta a una diminuzione dell'affinità di legame di queste proteine con i farmaci [190].

Oltre ai meccanismi di resistenza precedentemente descritti (efflusso, diminuzione della permeabilità di membrana), la resistenza agli aminoglicosidi può essere mediata dalla modificazione del bersaglio nel ribosoma 30S o dalla produzione di enzimi modificatori degli aminoglicosidi (AME; ad esempio, nucleotidiltransferasi, acetiltransferasi, fosfotransferasi) e di metiltransferasi del 16S rRNA. Questi enzimi agiscono modificando irreversibilmente la struttura chimica di questi farmaci (più comunemente i gruppi amminici e glicosidici) [191,192]. Questi enzimi modificatori sono comunemente acquisiti tramite HGT. La colistina è attualmente considerata un antibiotico di ultima istanza e salvavita per le infezioni da Gram-negativi XDR e, a causa degli sviluppi della resistenza antimicrobica, l'uso di questo agente è in aumento (nonostante lo svantaggioso profilo di effetti collaterali e il difficile dosaggio del farmaco) [193]. Prima dell'inizio degli anni 2010, la resistenza alla colistina era descritta solo attraverso mutazioni nei geni cromosomici (ad esempio, *ccrB*, *mgrB*, *pmrAB*, *phoPQ*), che venivano trasferiti verticalmente [194]. Di conseguenza, nel 2015 è stata rilevata una resistenza alla colistina mediata da plasmidi, in cui è stato trovato un plasmide trasmissibile di resistenza alla colistina mobile (mcr-1) [195]. Questo si è rivelato un problema critico, in quanto era ormai possibile la diffusione della resistenza alla colistina attraverso elementi genetici mobili. Ad oggi, sono stati descritti dieci diversi geni *mcr* (da *mcr-1* a *mcr-10*) con molte varianti, provenienti da tutti i Paesi tranne l'Antartide [196]. Questa resistenza è

mediata dall'operone arnBCADTEF e comporta l'aggiunta di 4-amino-4-deossi-L-arabinosio e fosfoetanolammina alla componente lipidica A dell'LPS dei Gram-negativi; questo, a sua volta, porterà alla capacità della colistina di interagire con l'LPS, bloccando l'autofacilitazione dell'assorbimento [197]. In caso di basse concentrazioni di cationi bivalenti (Mg2+ e Ca2+), si attiva un sistema di regolazione a due componenti (PhoPQ e PmrAB), che porta anch'esso alla resistenza alla colistina [198].

9.3.4 PRINCIPALI MECCANISMI DI RESISTENZA AI β-LATTAMICI IN *P. AERUGINOSA*

Come già menzionato, i β-lattamici sono la scelta terapeutica più comune per le infezioni *da Pseudomonas*; i carbapenemi spesso rappresentano le ultime alternative terapeutiche sicure in molte infezioni MDR [199]. Ciò è particolarmente vero dopo l'emergere e la diffusione a livello globale di batteri intestinali produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) [200]. A causa dell'uso estensivo di questi farmaci salvavita, l'emergere della resistenza ai carbapenemi in NFGNB e nei batteri intestinali (ad esempio, *E. coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* species) è in costante aumento [201]. Tra i NFGNB, *S. maltophilia* presenta una resistenza intrinseca ai carbapenemi (dovuta a due metallo-β-lattamasi codificate a livello di cromosomi), mentre nel caso di *Acinetobacter* e *Pseudomonas* sono più comuni i meccanismi acquisiti [202,203]. In base ai risultati di una recente meta-analisi, l'acquisizione di *P. aeruginosa* resistente ai carbapenemi è stata associata non solo all'uso precedente di carbapenemi, ma anche alla storia di assunzione di piperacillina-tazobactam e vancomicina [173]. La resistenza ai β-lattamici può essere mediata da vari meccanismi di resistenza, tra cui mutazioni (sottoregolazione o assenza) nei canali delle porine, sovraespressione delle pompe di efflusso e cambiamenti PBP, mentre il più comune è l'espressione di varie β-lattamasi (mentre molte fonti sottolineano che la resistenza ai carbapenemi è solitamente causata da una combinazione di diversi fattori) [204,205]. Tuttavia, le β-lattamasi mostrano uno

spettro di attività molto diverso e la loro potenza è influenzata anche dai livelli di espressione fenotipica negli isolati [206].

Alcune modifiche specifiche di PPB possono portare a una minore suscettibilità ai β-lattamici, anche se questo meccanismo è meno comune rispetto ai batteri Gram-positivi: le alterazioni PBP1 interessano di solito le cefalosporine, mentre PBP2 è importante sia per le cefalosporine che per i carbapenemi, e le modifiche PBP3 influenzano l'affinità di legame dell'imipenem; infine, PBP4 è rilevante per il legame di imipenem e meropenem [207]. Le specie di *Pseudomonas* sono caratterizzate da una β-lattamasi di tipo C (AmpC) codificata a livello di cromosomi, che è espressa a bassi livelli in circostanze normali; tuttavia, la somministrazione di molti antibiotici può portare all'induzione e alla de-repressione stabile di questo enzima (forti induttori includono ceftazidima, carbapenem e acido clavulanico (ad es, nella ticarcillina-clavulanato)), portando a una resistenza di alto livello alle cefalosporine con attività anti-*pseudomonas*, risparmiando i carbapenemi [208,209]. Inoltre, le mutazioni con perdita di funzione nel gene *ampD* (che codifica per il composto repressore dell'espressione di AmpC) determinano anche un'iperproduzione di questa β-lattamasi [210]. Per questo motivo, le specie di *Pseudomonas* fanno parte degli organismi "SPACE" (*Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* ed *Enterobacter*), caratterizzati dalla presenza di resistenza inducibile all'AmpC. L'attività dell'AmpC non è inibita dagli inibitori delle β-lattamasi di prima generazione, come l'acido clavulanico, il sulbactam o il tazobactam [211]. Oltre all'AmpC, *Pseudomonas* spp. può essere portatore di varie β-lattamasi a spettro stretto o ampio. Tra le β-lattamasi, le carbapenemasi di origine plasmidica (serina o metallo-β-lattamasi) possiedono il più ampio spettro di substrati (tra cui la maggior parte delle penicilline, delle cefalosporine e dei carbapenemi); pertanto, eliminano questi farmaci come possibili opzioni terapeutiche [212,213]. Mentre le carbapenemasi Ambler di classe A, come la KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) e la GES (Guiana Extended spectrum, in particolare la GES-2), e gli enzimi di classe D, come i membri della famiglia OXA-48-like

(Oxacillinase), possono essere rilevati anche in *Pseudomonas* resistenti ai carbapenemi, il principale tipo di carbapenemasi di questo genere è rappresentato dalle metallo-β-lattamasi (MBL) [214,215,216]. Infatti, il primo determinante di resistenza ai carbapenemi trasferibile attraverso le MBL è stato riportato in un isolato di *P. aeruginosa* in Giappone (1991; Imipenemasi 1, IMP-1) [217]. La scoperta di IMP-1 è stata seguita dalla descrizione di VIM-1 (1997; Verona Imipenemase 1, VIM-1) in un isolato di *P. aeruginosa* [218]; in entrambi i casi, i geni che codificano per la MBL sono stati trovati su una cassetta genetica inserita in un integrone di classe 1. Da allora, sono state descritte diverse nuove MBL in batteri Gram-negativi, tra cui AIM (Australian Imipenemase), DIM (Dutch Imipenemase), GIM (German Imipenemase), KHM (Kyorin University Hospital), NDM (New Delhi MBL), SIM (Seul Imipenemase), SPM (Sao Paulo MBL) e TMB (Tripoli MBL) [219,220]. In condizioni di laboratorio, le carbapenemasi possono essere differenziate attraverso l'inibizione di varie molecole (ad esempio, l'acido etilendiamminotetraacetico per le MBL, l'acido boronico per gli enzimi di tipo serinico), ma è più difficile da realizzare a causa della bassa permeabilità della membrana esterna di *P. aeruginosa*, che può alterare significativamente il fenotipo di resistenza [221,222].

Lo Pseudomonas resistente ai carbapenemi è una delle principali preoccupazioni nei Paesi a basso e medio reddito. Le infezioni e la colonizzazione con batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi sono state associate a maggiori costi economici, degenze ospedaliere più lunghe e risultati clinici peggiori rispetto alle loro controparti sensibili ai carbapenemi [223]. I pazienti con batteriemia causata da *Pseudomonas* resistenti ai carbapenemi avevano probabilità di mortalità 3 volte superiori rispetto alle infezioni da specie sensibili ai carbapenemi [224]. Sulla base della letteratura internazionale, i tassi di resistenza ai carbapenemi nello *Pseudomonas* variano tra il 10% e il 50%, con marcate differenze geografiche [225]. Il CDC ha riportato tassi di resistenza ai carbapenemi fino al 12% in alcune parti degli Stati Uniti [226]. La percentuale media ponderata per la popolazione di *P. aerugi-*

nosa resistente ai carbapenemi è stata del 17,2% nel 2018, mentre nello stesso anno tale rapporto era del 30,7% in Cina [144]. In Europa, la Grecia ha una prevalenza molto alta di resistenza ai carbapenemi nello *Pseudomonas* (40,4% nel 2015, in base ai dati della Rete europea di sorveglianza della resistenza antimicrobica), che corrisponde all'ampio uso di questi farmaci [227]. I rapporti precedenti (prima del 2000) evidenziavano il ruolo critico dell'inattivazione dell'OprD e delle pompe di efflusso nella resistenza ai carbapenemi, mentre quelli più recenti mostrano che le carbapenemasi stanno assumendo un ruolo sempre più critico [228]. Il clone ST235, di grande successo, è uno dei principali cloni resistenti ai carbapenemi, che si sono diffusi in tutto il mondo. Questo clone è solitamente portatore di metallo-β-lattamasi, compresi gli enzimi IMP, NDM e VIM [38,70,71].

9.3.5 *P. AERUGINOSA* RESISTENTE AI CARBAPENEMI MA SENSIBILE ALLE CEFALOSPORINE (CAR-R CEPH-S)

La resistotipizzazione è un metodo relativamente antico di differenziazione tra i ceppi batterici, che ha riscosso un nuovo interesse nell'era della resistenza estesa nei batteri [229]. Il principio della resistotipizzazione prevede di testare i ceppi batterici contro agenti chimici selezionati in modo arbitrario (cioè gli antibiotici usati clinicamente nei laboratori di microbiologia) per differenziarli in base alla presenza/assenza di resistenza a substrati chimici selezionati, generando così un modello di resistenza per ceppi caratteristico della regione geografica [229]. La comparsa di uno specifico resistotipo di *P. aeruginosa*, ovvero l'emergere di ceppi sensibili alle cefalosporine (Car-R/Ceph-S) tra gli isolati resistenti ai carbapenemi, ha ricevuto una notevole attenzione da parte dei microbiologi clinici e degli specialisti del controllo delle infezioni; tuttavia, la letteratura disponibile su questo argomento è ancora scarsa. Nella sezione che segue, il nostro obiettivo è stato quello di raccogliere e riassumere i dati attualmente disponibili su questo raro resistotipo, compresi i documenti epidemiologici e gli studi sulla loro caratterizzazione fenotipica e

genotipica. La maggior parte dei rapporti proviene dall'Estremo Oriente, mentre sono disponibili anche alcune pubblicazioni dal continente europeo e dal Medio Oriente.

In uno studio durato tre anni, Ferreiro et al. hanno registrato sessantadue (n = 62) casi di Car-R/Ceph-S che hanno causato UTI nosocomiali: nel loro studio è stato registrato anche il tasso di mortalità grezzo, pari al 17,7% [179]. Shigemura et al. hanno riportato settantasei (n = 76) pazienti (77,6% maschi) con UTI da Car-R/Ceph-S *P. aeruginosa* in quattro anni [230]. Zeng et al. hanno raccolto Car-R/Ceph-S *P. aeruginosa* nella seconda metà del 2011 e hanno trovato n = 29 isolati individuali. Durante il loro studio, gli isolati sono stati caratterizzati con metodi di Western blotting e PCR in tempo reale (RT-PCR). Non si è rilevata un'espressione di β-lattamasi di tipo AmpC e di carbapenemasi in questi isolati, mentre la stragrande maggioranza ha mostrato una ridotta espressione o la delezione delle porine OprD come principale determinante della resistenza [231]. Li et al. hanno caratterizzato Car-R/Ceph-S *P. aeruginosa* isolata da batteriemie in un periodo di 8 anni (2010-2017): sono stati raccolti 63 isolati, la maggior parte dei quali presentava una sovraespressione delle pompe di efflusso e una ridotta espressione di OprD [232]. I risultati di Li et al. corrispondono a quelli di Zeng et al., poiché anche in questi isolati non è stata evidenziata la produzione di β-lattamasi rilevanti. Il tasso di mortalità complessivo a 30 giorni tra il 2010 e il 2017 è risultato pari al 27,0% nei pazienti colpiti [231]. Nello studio di laboratorio di Wi et al. sono stati trovati diciotto isolati (23,3%) sensibili al ceftazidime tra i ceppi di *P. aeruginosa* resistenti all'imipenem. La sovraespressione dei geni delle pompe di efflusso (*mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*) è stata riscontrata in 13/18 ceppi, 2/18 hanno mostrato una sovraespressione di AmpC β-lattamasi, mentre è stata identificata in 18/18 ceppi una ridotta espressione del gene oprD [233].

Duecentonovantatré isolati di *P. aeruginosa* Car-R/Ceph-S sono stati caratterizzati da Khuntayaporn et al. durante un periodo di studio di tre anni. La prevalenza osservata dei determinanti di resistenza è stata la seguente: produzione di β-lattamasi di tipo

AmpC 3,9%, produzione di metallo-β-lattamasi (MBL) 18,5%, sovraespressione della pompa di efflusso 63,5% e ridotta espressione del gene *oprD* 93,3%, rispettivamente [234]. Campana et al. hanno riportato venticinque isolati di Car-R/Ceph-S provenienti da vari tipi di campioni clinici: >90% presentava livelli ridotti di espressione del gene oprD, mentre la sovraespressione delle pompe di efflusso o la produzione dei principali tipi di β-lattamasi (rilevata con il metodo della spettrometria di massa a desorbimento laser assistito/ionizzazione a tempo di volo [MALDI-TOF MS] [*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*] e RT-PCR) non sono state evidenziate in questi isolati [235]. Zaidenstein et al. hanno riportato sessantasette infezioni del flusso sanguigno da Car-R/Ceph-S in sindromi cliniche monobatteriche in un periodo di 5 anni (2010-2014). Gli autori hanno osservato che in questi casi le cefalosporine sono state considerate come opzioni terapeutiche rilevanti [236]. Tsai et al. hanno caratterizzato *n* = 14 isolati di *P. aeruginosa*, resistenti solo ai carbapenemi. Nel 93% (14/15) degli isolati è stata riscontrata una ridotta espressione di OprD, che è il principale responsabile della resistenza selettiva ai carbapenemi in questi batteri [237]. Pena et al. hanno riportato un'epidemia nosocomiale, causata da un *P. aeruginosa* resistente a cefepime e carbapenemi, ma sensibile al ceftazidime, che ha colpito 23 pazienti in Spagna. Dopo la caratterizzazione molecolare dell'isolato, si è scoperto che sovraesprimeva la pompa di efflusso MexXY-OprM e produceva una PSE-1 β-lattamasi trasportata dall'integrone [238]. Pournaras et al. hanno raccolto dodici Car-R/Ceph-S nel 2003 e nessuno dei ceppi era positivo per le carbapenemasi; al contrario, 12/12 isolati erano positivi per la *mexB*, 11/12 per la *mexY*, mentre 10/12 erano anche positivi per la sovraespressione rispettivamente della *mexB* e 5/12 per la *mexY* [239].

Khalili et al. hanno identificato *n* = 23 isolati di *P. aeruginosa* Car-R/Ceph-S (9,5% degli isolati testati) in un periodo di tre anni (2016-2018). La sovraespressione della pompa di efflusso e la produzione di β-lattamasi sono state valutate a livello di fenotipo: Il 60,9% ha mostrato una sovraespressione della pompa di

efflusso, mentre l'iperproduzione di AmpC è stata evidenziata nel 4,3%. La sovraespressione di pompe di efflusso rilevanti è stata rilevata anche mediante RT-PCR nel 68,8% degli isolati [240]. Lee et al. hanno condotto uno studio retrospettivo caso-controllo su pazienti con batteriemia da *P. aeruginosa* Car-R/Ceph-S e pan-suscettibile nell'arco di 6 anni (2004-2010): sono stati registrati *n* = 25 pazienti con infezioni del flusso sanguigno da Car-R/Ceph-S, la loro mortalità è stata quasi tre volte superiore a quella del gruppo di controllo (72% vs. 26%) e la resistenza ai carbapenemi è risultata l'unico fattore di rischio indipendente per la mortalità [241]. In uno studio prospettico di un anno sui Gram-negativi non fermentanti in Egitto, Wafy et al. hanno trovato *n* = 29 isolati resistenti ai carbapenemi (meropenem) tramite test fenotipici; tuttavia, di questi isolati, solo *n* = 15 erano anche resistenti alle cefalosporine anti-pseudomonas [242]. Rodulfo et al. hanno voluto confrontare la presenza del fenotipo MDR e XDR in *Pseudomonas* con la presenza di vari fattori di virulenza. Oltre alla presenza di isolati Car-R/Ceph-S (segnalati come ~13% del pool complessivo di isolati), il loro rapporto ha evidenziato il continuo aumento dei tassi di resistenza agli antibiotici β-lattamici e agli integroni di classe I tra il 2009 e il 2016 (37,1% vs. 50,0% per i piperici).1% vs. 50,0% per piperacillina-tazobactam, 32,3% vs. 50% per ceftazidime, 33,9% vs. 50% per cefepime, 38,7% vs. 65,6% per imipenem e 37,1% vs. 59,4% per meropenem). Hanno anche trovato un'associazione positiva tra il fenotipo MDR/XDR e la presenza di emolisina, del gene *exoU* e dell'integrasi I [243]. Nello studio di Khan et al. sono state confrontate le caratteristiche di resistenza di isolati di *P. aeruginosa* che causano cheratite, provenienti da Australia e India [73]. Tutti gli isolati presentavano un gene di resistenza ai β-lattamici (*blaPAO*), la maggior parte degli isolati australiani presentava *blaOXA-396*, mentre altri geni di resistenza ai β-lattamici erano presenti sia negli isolati australiani che in quelli indiani (ad esempio, *blaOXA-486*, *blaOXA-488*, *blaOXA-396* e *blaOXA-50*), anche se molto meno comunemente. I tassi di resistenza erano del 78% per l'imipenem e del 57% per la ceftazidima, e del 58% per

l'imipenem e del 50% per la ceftazidima, rispettivamente negli isolati indiani e australiani [73].

In uno degli studi più recenti sull'argomento, condotto nell'Ungheria meridionale, è stata valutata la presenza di *P. aeruginosa* Car-R/Ceph-S in UTI in un periodo di sorveglianza di 10 anni. Complessivamente, sono stati individuati 57 isolati di questo tipo e questi batteri sono stati caratterizzati con metodi fenotipici: 4/57 isolati hanno prodotto carbapenemasi, 7/57 isolati hanno mostrato la sovrapproduzione di una β-lattamasi AmpC, 31/57 hanno sovraespresso pompe di efflusso, mentre nel caso di 15/57 isolati non è stato possibile ottenere dati conclusivi per i determinanti di resistenza utilizzando i metodi fenotipici [244]. È interessante notare che è stata identificata la prima MBL a trasmissione tramite integroni da *P. aeruginosa,* in Ungheria [245]. Sulla base delle relazioni descritte in precedenza, esiste un numero piccolo ma rilevante di isolati di *Pseudomonas* Car-R (4-20 isolati/anno, sulla base delle relazioni sopra citate), in cui gli antibiotici β-lattamici di "vecchia" generazione (cioè, ceftazidime e cefepime) possono ancora essere rilevanti per la terapia. Ciò consente un uso speciale e più consapevole di questi agenti come riserva. La scelta di questi agenti al posto della colistina offre una possibilità di stewardship antimicrobica/risparmio di colistina [246]. Anche se con un margine ridotto, i livelli superiori di suscettibilità di ceftazidime e cefepime in *P. aeruginosa* sono stati recentemente evidenziati nel programma di sorveglianza dell'International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) (ceftazidime: 85,1%, cefepime: 86,1%, meropenem: 80,2%) [247].

Nonostante la crescente letteratura disponibile sull'argomento, non c'è consenso sui meccanismi di resistenza più comuni che contribuiscono all'emergere di isolati Car-R/Ceph-S. Esistono ampie differenze nella prevalenza delle carbapenemasi (soprattutto per le MBL) e questo può influire anche sulla suscettibilità alle cefalosporine [73,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244]. Khalili et al. hanno proposto che l'individuazione di isolati Car-R/Ceph-S dipenda dall'assenza di

carbapenemasi [240]. Insieme ai livelli da bassi a moderati di produzione di AmpC, questi isolati possono mostrare suscettibilità a ceftazidime e cefepime, come dimostrato in queste relazioni. D'altra parte, l'importanza delle mutazioni della porina OprD in presenza di resistenza ai carbapenemi è stata dimostrata da diversi studi. Infatti, le alterazioni della porina sono uno dei meccanismi di resistenza più comuni dopo l'esposizione ripetuta ai carbapenemi [176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189]. I rapporti della letteratura citati evidenziano l'importanza della sorveglianza continua dei patogeni batterici con β-lattamasi (compresi i metodi fenotipici e molecolari) per aiutare gli interventi di stewardship antimicrobica e per contribuire all'utilizzo delle alternative terapeutiche più sicure e appropriate [248].

9.4 OPZIONI TERAPEUTICHE EMERGENTI PER LE INFEZIONI DA *PSEUDOMONAS*

Sebbene negli ultimi dieci anni ci siano stati dei progressi nell'autorizzazione all'immissione in commercio di nuovi antibiotici e di terapie combinate, il loro prezzo e la loro disponibilità potrebbero ostacolarne l'uso diffuso nel prossimo futuro. Inoltre, si discute su quanto a lungo i nuovi agenti possano gestire il peggioramento della situazione di resistenza [146,157,249,250,251,252,253,254]. Con lo scoraggiante aumento dei tassi di resistenza antimicrobica in tutti i tipi di batteri, uno degli obiettivi principali della ricerca antimicrobica è l'esplorazione di nuovi approcci oltre gli antibiotici convenzionali, ad esempio batteriofagi, peptidi antimicrobici con diverse strutture e meccanismi d'azione, inibitori della virulenza, siderofori, composti di origine naturale (come gli oli essenziali) e altri coadiuvanti (ad es, inibitori della pompa di efflusso, anticorpi monoclonali) (Tabella 3) [118,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270]. È possibile che nei prossimi due decenni questi agenti giochino un ruolo importante nella gestione delle infezioni batteriche gravi causate da *P. aeruginosa* e da altri patogeni di importanza critica.

Strategia terapeutica emergente	Descrizione (se pertinente)
Nuovi antibiotici, terapia di combinazione antibiotica	Ceftolozane/tazobactam, ceftazidim/avibactam, imipenem/cilastatina/relebactam, meropenem/vaborbactam, plazomicina, delafloxacina
Farmaci esistenti in nuove formulazioni	tobramicina nebulizzata o liposomiale, levofloxacina, aztreonam lisina, fosfomicina, colistina e liposimile utilizzati per il trattamento di *P. aeruginosa* nei polmoni dei pazienti affetti da FC
Terapia fagica, endolisine	Battericida, altamente specifico per i batteri bersaglio senza influenzare i batteri commensali, efficace contro gli isolati MDR, attività sinergica con gli antibiotici, può penetrare nei biofilm densi. Endolisine: degradano il peptidoglicano batterico dall'interno della cellula durante il ciclo litico dei fagi.
Siderofori, chelazione del ferro	È stata proposta come strategia terapeutica emergente la modifica del metabolismo del ferro. Gallio (Ga3+): gli studi clinici includono il gallio-nitrato per via endovenosa (GaNite) e la co-incapsulazione di Ga-gentamicina in pazienti affetti da FC. L'esatto meccanismo d'azione del Ga è ancora poco conosciuto. Alcuni studi propongono che il Ga interferisca con l'assorbimento del ferro (Fe), il metabolismo del Fe e inibisca la funzione degli enzimi respiratori contenenti Fe; tuttavia, questa spiegazione è stata ritenuta insoddisfacente, poiché la maggior parte dei composti che influenzano il metabolismo del Fe o agiscono attraverso la chelazione sono batteriostatici, mentre il Ga ha una rapida attività battericida. Studi più recenti suggeriscono che il trattamento con Ga agisca attraverso la generazione di ROS e l'inibizione dei meccanismi di difesa antiossidanti nei batteri.
Inibizione delle lectine	Inibizione del legame di LecA/LecB alle cellule epiteliali polmonari.

Inibizione del quorum sensing (QS), inibizione della virulenza	Inibizione della sintesi o del rilevamento delle molecole segnale, che può impedire ai batteri di adattarsi a nicchie ecologiche diverse, di eludere il sistema immunitario e di produrre fattori di virulenza. Gli inibitori della virulenza possono "disarmare" i batteri, che quindi non saranno in grado di indurre le loro patologie caratteristiche in vivo. Inoltre, poiché i QS e gli inibitori della virulenza non hanno come bersaglio componenti cellulari essenziali (il che porta a livelli elevati di pressione di selezione e all'emergere di mutanti resistenti), è improbabile che il microbioma dell'ospite venga influenzato o che si verifichi una rapida resistenza contro questi agenti.
Inibitori della pompa di efflusso	
Peptidi antimicrobici (AMP)	
Terapia fotodinamica	
Sviluppo di vaccini	
Nanoparticelle (NPs)	
Anticorpi monoclonali	
Coniugati	
Composti naturali, oli essenziali	

Tabella 3. *Alternative terapeutiche nuove ed emergenti in P. aeruginosa [*118,146,157,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270*].*

9.5 OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

La P. aeruginosa, un importante membro del gruppo dei batteri Gram-negativi non fermentanti, ha ricevuto una notevole attenzione negli ultimi anni, associata a molte manifestazioni patologiche diverse, soprattutto nei pazienti ospedalizzati e/o immunocompromessi. L'emergere di ceppi MDR, XDR e PDR di *P. aeruginosa* è un'importante preoccupazione per la salute pubblica, che comporta difficoltà nelle scelte terapeutiche. Gli antibiotici β-lattamici sono tra i farmaci più importanti nella terapia delle

infezioni da *Pseudomonas*, con particolare attenzione ai carbapenemi, considerati antibiotici di riserva fin dalla loro introduzione negli anni '80 [271]. Tuttavia, l'aumento globale dell'utilizzo di questi farmaci (sia per le infezioni causate da NFGNB che da *Enterobacterales*) ha portato all'espansione di ceppi resistenti ai carbapenemi in tutte le parti del mondo [272]. Questi sviluppi devono essere considerati molto allarmanti. La comparsa di uno specifico resistotipo di *P. aeruginosa*, ovvero ceppi resistenti ai carbapenemi ma sensibili alle cefalosporine (Car-R/Ceph-S), ha suscitato un notevole interesse, in quanto questi rari casi possono offrire l'opportunità di utilizzare antibiotici β-lattamici più vecchi, invece di usare altri agenti di ultima istanza con maggiore tossicità, e di limitare lo sviluppo della pressione di selezione su questi batteri.

10 - INGEGNERIA DEL GENOMA BATTERICO E BIOLOGIA SINTETICA: LOTTA AGLI AGENTI PATOGENI

Tratto e tradotto da

Krishnamurthy M., Moore R.T., Rajamani S. et al. *Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens.* BMC Microbiol 16, 258 (2016).

https://doi.org/10.1186/s12866-016-0876-3

Abstract

Premesse

L'emergere e la prevalenza di batteri patogeni multiresistenti (MDR) rappresenta una grave minaccia per la salute umana e animale a livello globale. Le infezioni nosocomiali e i disturbi più comuni, come polmonite, infezioni delle ferite, del tratto urinario e del flusso sanguigno, stanno diventando sempre più difficili da trattare a causa della rapida diffusione dei batteri patogeni MDR. Secondo dei report recenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dei Centri per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie (CDC), si registra un aumento senza precedenti delle infezioni MDR in tutto il mondo. L'aumento di queste infezioni ha generato uno stress economico a livello mondiale, spingendo l'OMS ad approvare un piano d'azione globale per migliorare la consapevolezza e la comprensione della resistenza antimicrobica. Questa crisi sanitaria richiede un'azione immediata per individuare i meccanismi alla base della resistenza ai farmaci nei batteri.

Ricerca

L'avvento di nuovi strumenti di ingegneria del genoma batterico e di biologia sintetica (SB) sta fornendo promettenti piani diagnostici e terapeutici per monitorare e trattare infezioni batteriche recalcitranti molto diffuse. I principali progressi negli approcci di ingegneria genetica possono aiutare a indirizzare e modificare i genomi dei batteri patogeni con

successo, in modo da comprendere e mitigare i meccanismi di resistenza ai farmaci. In questa rassegna discutiamo l'applicazione di metodi specifici di ingegneria genomica e di SB, come la ricombinazione, le sequenze ripetute palindrome brevi raggruppate a intervalli regolari (CRISPR [*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*]) e i meccanismi di segnalazione delle cellule batteriche per il targeting dei patogeni. L'utilità di questi strumenti nello sviluppo di strategie antibatteriche, come la produzione di nuovi antibiotici, la fagoterapia, la diagnostica e la produzione di vaccini, solo per citarne alcune, sono evidenziate.

Conclusioni

L'uso prevalente di antibiotici e la diffusione di batteri MDR sollevano la prospettiva di un'era post-antibiotica, il che sottolinea la necessità di sviluppare nuove terapie per colpire i patogeni MDR. Lo sviluppo di tecnologie SB abilitanti offre soluzioni promettenti per fornire terapie antibatteriche sicure ed efficaci.

10.1 SFONDO

L'emergenza di organismi patogeni multiresistenti ai farmaci (MDR) è diventata un'importante sfida per la salute nazionale e globale. È importante notare che l'evoluzione dei patogeni batterici MDR è dilagante e richiede contromisure immediate per limitare i danni duraturi. Secondo un report dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2014 sulla sorveglianza globale della resistenza antimicrobica, l'aumento dei batteri patogeni MDR sta mettendo a rischio la capacità di trattare a livello globale dei disturbi comuni come le infezioni del tratto urinario, la polmonite e le infezioni del flusso sanguigno, che per decenni sono stati facilmente curabili. Nel 2015, la 68a Assemblea Mondiale della Sanità ha approvato un piano d'azione globale per migliorare la consapevolezza e la comprensione della resistenza antimicrobica [1]. Questo piano richiede

lo sviluppo di nuovi farmaci, strumenti diagnostici, vaccini e altri interventi per garantire il trattamento e la prevenzione delle malattie infettive causate dai batteri. Pertanto, è urgente comprendere i meccanismi di resistenza ai farmaci negli agenti patogeni MDR e puntare su questi meccanismi (ad esempio, la mutazione del sito bersaglio dell'antibiotico, la pompa di efflusso per l'espulsione dell'antibiotico, ecc. Inoltre, l'identificazione di piccole molecole terapeutiche nuove e migliorate e l'ingegneria metabolica per la produzione di queste piccole molecole è un altro approccio per attenuare la resistenza ai farmaci nei patogeni MDR).

I recenti progressi della biologia sintetica (SB) hanno permesso lo sviluppo di nuovi strumenti di ingegneria genomica per la manipolazione dei genomi microbici per varie applicazioni biotecnologiche e biomediche [2-6]. La SB offre una piattaforma innovativa per colmare il divario tra ricerca di base e traslazionale e ha il potenziale per fornire soluzioni innovative per combattere gli agenti infettivi. La SB è un campo emergente che combina principi ingegneristici e parti biologiche per progettare prodotti genici o circuiti genetici nuovi, modulari e sintonizzabili per modificare sistemi biologici esistenti.

Oltre alla costruzione di circuiti genici per le funzioni cellulari desiderate o per l'ingegneria metabolica, vi è un crescente interesse tra i biologi sintetici per lo sviluppo di strumenti di ingegneria del genoma microbico. Le modifiche mirate del genoma batterico hanno portato alla creazione di tratti biologici utili in ceppi ingegnerizzati. Il connubio tra strumenti di ingegneria genomica e SB ha permesso di utilizzare i batteri ingegnerizzati per affrontare alcune sfide globali, dalle energie rinnovabili alla salute globale. In particolare, i recenti progressi nell'ingegneria del genoma batterico in grado di colpire vari ospiti batterici hanno aperto nuove strade per combattere le infezioni batteriche [7, 8]. Lo sviluppo di nuovi strumenti di SB dovrebbe aprire la strada a nuovi approcci per affrontare l'imminente minaccia della resistenza agli antibiotici nei batteri.

Le applicazioni di SB nei batteri hanno spaziato dalla costruzione di piccoli circuiti genici per la funzione di un gene/percorso desiderato all'ingegneria dell'intero genoma [9-12]. Numerose ricerche condotte con l'SB hanno anche permesso di comprendere i meccanismi di resistenza agli antibiotici. Ad esempio, per delineare il meccanismo di resistenza a un particolare antibiotico sono state usate concentrazioni letali di triclosan in *Escherichia coli per* identificare i geni candidati coinvolti nella resistenza al triclosan [13]. È stata generata una libreria genomica sovraespressa in terreni arricchiti di triclosan e, utilizzando un microarray di DNA, sono stati identificati e validati i geni che consentivano la crescita di *E. coli* in presenza di triclosan, sovraesprimendo il gene candidato nei batteri [14].

A differenza dei metodi tradizionali, che prevedono il sequenziamento del genoma per identificare potenziali geni che conferiscono resistenza agli antibiotici, questo approccio ha usato librerie di genomi clonati in plasmidi per l'espressione nei batteri e l'arricchimento in presenza di antibiotici. Tale approccio SB consente uno screening a livello di genoma e di identificare i geni, ma anche l'effetto della sovraespressione di questi geni sulla fitness cellulare.

Ciò è particolarmente utile per comprendere i complessi meccanismi della resistenza agli antibiotici e per identificare uno o più bersagli genici che portano alla resistenza. Analogamente, i sistemi di risposta SOS in *E. coli* sottoposti ad altri antibiotici sono stati esaminati costruendo circuiti genici in *E. coli* per studiare il danno al DNA e comprendere il ruolo di questi sistemi nella resistenza agli antibiotici [15].

Sono stati sintetizzati genomi batterici minimi utilizzando approcci top-down e bottom-up per identificare i geni essenziali nei batteri (*E. coli*, *Pseudomonas putida, Mycoplasma*) per potenziali bersagli terapeutici [16-18]. Il potenziale di crescita e l'impatto delle SB nel contrastare la resistenza agli antibiotici sono chiaramente evidenti da questi esempi. L'obiettivo di questa rassegna è quello di evidenziare le applicazioni dell'in-

gegneria del genoma batterico e degli strumenti di biologia sintetica nel colpire i patogeni batterici emergenti e di discutere ulteriormente l'utilità della SB nel promuovere nuove terapie antibatteriche.

10.2 STRUMENTI DI INGEGNERIA DEL GENOMA E LORO APPLICAZIONI PER CONTRASTARE LE INFEZIONI BATTERICHE

Sono stati sviluppati diversi metodi per l'ingegnerizzazione dei genomi batterici con vari gradi di efficienza, specificità e ampia applicabilità all'ospite [19]. Il più delle volte, l'editing del genoma batterico viene effettuato per eliminare geni, inserire geni o introdurre mutazioni nel genoma batterico. Sebbene la maggior parte di questi metodi sia stata sviluppata in *E. coli*, nell'ultimo decennio si è assistito a un rapido sviluppo di questi strumenti su un'ampia gamma di ospiti batterici (Fig. 1a). Degna di nota è l'applicabilità di questi strumenti di ingegneria in altri batteri patogeni, che apre la strada all'esplorazione e alla comprensione di questi patogeni per combattere le infezioni batteriche. Diverse rassegne hanno illustrato in modo utile i principi e le tecniche degli strumenti di ingegneria del genoma batterico [7, 8]. Gli strumenti più comuni attualmente utilizzati per l'ingegneria del genoma dei batteri patogeni sono riassunti nella Tabella 1 e le loro potenziali applicazioni nella lotta alle infezioni batteriche sono discusse di seguito.

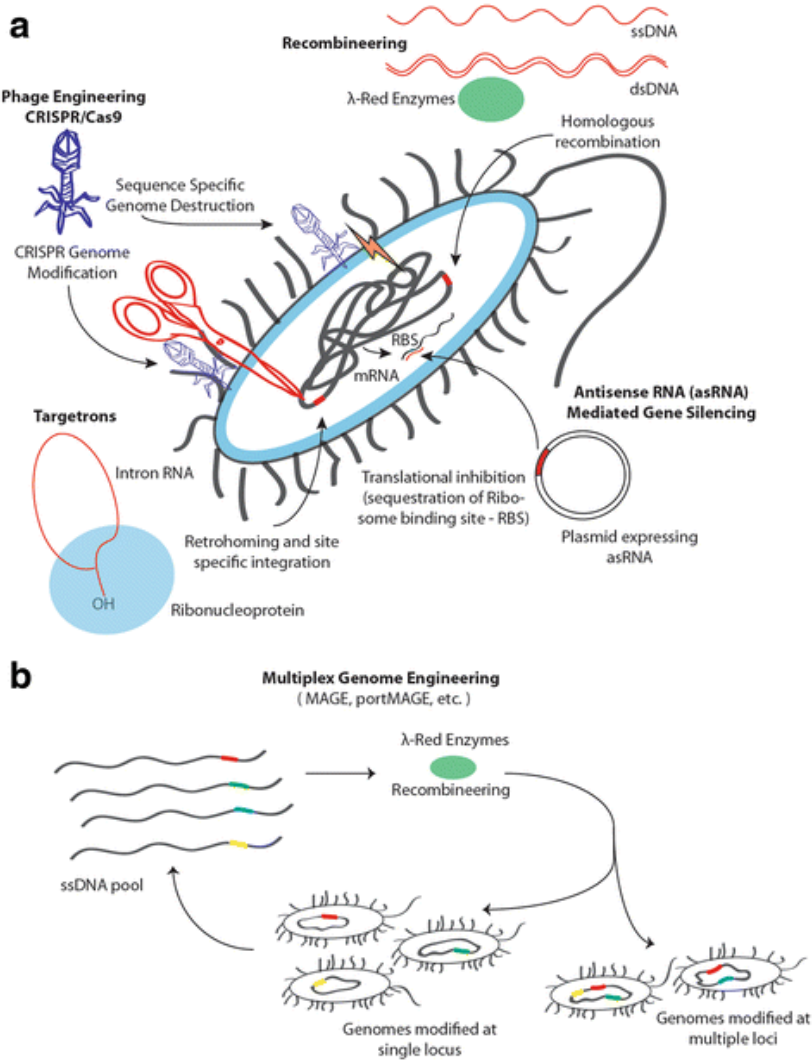


Figura 1. a) *Schema degli strumenti di ingegneria genomica sviluppati in E. coli ed estesi a molti altri ospiti batterici* b) *Multiplexed Automated Genomic Engineering (MAGE) per modificare i batteri in più loci genomici.* Immagine a grandezza naturale

Tabella 1 Strumenti disponibili nei batteri patogeni Gram-negativi e Gram-positivi per la modifica del genoma. Tabella a grandezza naturale

10.2.1 APPROFONDIMENTO DELLA VIRULENZA BATTERICA, DEL MECCANISMO DI RESISTENZA E DEI BERSAGLI BIOMOLECOLARI

Le modifiche cromosomiche batteriche hanno contribuito notevolmente alla comprensione della patogenesi batterica e dei meccanismi di virulenza. Tra i metodi di ingegneria del genoma, l'utilizzo del sistema della ricombinasi λ-Red per inserzioni, delezioni o mutazioni puntiformi del genoma è stato molto popolare. Pioniere di Murphy [20] e successivamente modificato da Datsenko e Wanner [21], questo metodo prevede l'introduzione per la ricombinazione di DNA a singolo o doppio filamento con regioni di omologia cromosomica [22]. Sin dalla sua ideazione, questa strategia di editing è stata resa più efficiente da modifiche al metodo sviluppato da Wanner [23-25]. La strategia è stata anche facilmente adattata a ceppi batterici patogeni per studiare il ruolo dei geni nella patogenesi [23, 26-29].

Pseudomonas aeruginosa, un patogeno opportunista che causa infezioni nosocomiali e infezioni croniche dei polmoni affetti da fibrosi cistica, utilizza i due sistemi di quorum sensing LasR/LasI e RhlR/RhlI per orchestrare la produzione di fattori di virulenza e la formazione di biofilm [30]. Per comprendere il loro ruolo nella virulenza di *P. aeruginosa*, la ricombinazione λ-Red è stata utilizzata con successo per generare ceppi mutanti Δ*lasR* e doppi mutanti Δ*lasR*/Δ*rhlR di P. aeruginosa per* delinearne le funzioni [31]. Utilizzando il saggio di infezione fast-kill a 24 ore di *Caenorhabditis elegans*, è stato dimostrato che *C. elegans* è stata uccisa più rapidamente dai ceppi wild-type e dal mutante Δ*lasR* rispetto al mutante Δ*rhlR* o al doppio mutante Δ*lasR*/Δ*rhlR*, indicando che la funzione di RhlR è importante per la virulenza.

Gli autori hanno inoltre identificato una piccola molecola chiamata meta-bromo-tiolattone (mBTL), un analogo dell'N-acil-L-omoserina lattone (AHL), una molecola di segnalazione cellulare nativa di *P. aeruginosa*, che ha dimostrato di attenuare la produzione di piocianina e biofilm nel ceppo wild-type. Per identificare se il recettore RhlR o LasR è il bersaglio molecolare di mBTL, è stato utilizzato il sistema di ricombinazione λ-Red per

generare doppi mutanti ΔlasR *e ΔlasR/ΔrhlR* e dimostrare che RhlR è il bersaglio in vivo di mBTL.

Uno degli adattamenti chiave di *Salmonella enterica serovar typhimurium*, un patogeno che causa il tifo nell'uomo, è la sua capacità di sopravvivere all'interno dei fagociti dell'ospite. I macrofagi esprimono l'ossido nitrico inducibile (NO) sintasi (iNOS) in risposta al lipide A, alle fimbrie e alle porine che si trovano sull'involucro di *Salmonella*.

In precedenza è stato dimostrato che l'NO prodotto come risposta innata dai macrofagi può avere un impatto sulla biosintesi degli aminoacidi in *Salmonella*, colpendo DksA. DksA è una proteina regolatrice dell'RNA polimerasi di *Salmonella che* è stata implicata nella resistenza del batterio. Per determinare se DksA è responsabile delle difese antinitrosative in *Salmonella*, Henard e Vazquez-Torres hanno generato un mutante *dks*A utilizzando la ricombinazione λ-Red [32, 33]. Hanno determinato che i ceppi di *Salmonella* mutanti Δ*dks*A sono ipersuscettibili agli effetti batteriostatici dell'NO e sono notevolmente attenuati nella loro infettività, come dimostrato in un modello murino di infezione sistemica acuta.

Per rendere l'editing del genoma ad alto rendimento, è stato recentemente sviluppato un metodo di ricombinazione chiamato Multiplex Automated Genome Engineering (MAGE), che sostituisce il metodo convenzionale di ricombinazione basato sulla λ-Red ricombinasi (Fig. 1b). Questo metodo impiega il sistema della ricombinasi λ-Red e un pool di oligo per introdurre rapidamente modifiche simultanee nel genoma *di E. coli* in pochi giorni [34]. Ulteriori miglioramenti a questo metodo, denominato pORTMAGE (*portable* MAGE), sono stati apportati ed estesi a ceppi clinicamente rilevanti come *Salmonella enterica* [35]. Utilizzando pORTMAGE, sono state introdotte simultaneamente dieci mutazioni di resistenza agli antibiotici nel genoma di *S. enterica* ed *E. coli* per studiare il grado di conservazione dei meccanismi molecolari di resistenza agli antibiotici tra questi batteri.

Per i batteri che non sono trattabili con i comuni metodi di ingegneria, come il sistema della ricombinasi λ-Red, sono

stati utilizzati gli introni mobili di gruppo II per l'editing sito-specifico del genoma. Gli introni mobili di gruppo II sono retrotrasposoni batterici che contengono un RNA intronico e una trascrittasi inversa codificata dall'introne. Gli introni mobili di gruppo II sono ribozimi che possono inserirsi in bersagli specifici mediante il processo di *retrohoming* [36]. Utilizzando algoritmi predittivi, l'introne RNA può essere ridisegnato per formare un "targetron", in modo da modificare un sito di DNA bersaglio a scelta.

Questo metodo è stato adattato a diversi ceppi patogeni per comprendere i meccanismi di virulenza [37]. Per diverse specie di *Clostridium* di rilevanza medica, che non tollerano le ricombinazioni, è stato sviluppato un metodo basato su targetron, denominato tecnologia ClosTron, che ha consentito di modificare il genoma con successo [38]. In un esempio, la tecnologia ClosTron è stata utilizzata per la mutagenesi orientata al sito di una proteasi specifica della germinazione chiamata CspC in *Clostridium difficile*, un agente causale di infezioni alimentari e diarrea. Questo studio ha contribuito a determinare il ruolo della CspC nel riconoscimento degli acidi biliari dell'ospite per la germinazione in vivo e l'insorgenza della malattia [39].

In un altro esempio, la tecnologia targetron è stata utilizzata per studiare il meccanismo di virulenza di *Pasteurella multocida*, un patogeno animale che causa il colera negli uccelli selvatici e nel pollame, la setticemia emorragica negli ungulati e la rinite atrofica nei suini.

La capsula polisaccaridica composta da acido ialuronico è uno dei principali fattori di virulenza. Per studiare il meccanismo di formazione della capsula e convalidare il ruolo del regolatore trascrizionale globale Fis nella formazione della capsula, Steen e collaboratori hanno utilizzato la tecnologia targetron di *Pasteurella* per generare mutanti *Fis* [40]. Hanno determinato che non solo la proteina Fis è necessaria per la formazione della capsula, ma anche per la regolazione di un certo numero di geni di virulenza.

10.2.2 PRODUZIONE DI NUOVI ANTIBIOTICI

La velocità con cui i batteri sviluppano resistenza agli antibiotici esistenti è allarmante e giustifica la nostra immediata attenzione allo sviluppo di nuovi antibiotici per combattere i patogeni batterici. In genere, gli antibiotici sono piccole molecole di derivazione naturale prodotte da percorsi geneticamente codificati. Rappresentano una ricca fonte di diversità chimica e sono prodotti da una serie di microrganismi. L'uso di strumenti di editing del genoma per ingegnerizzare nuove vie biosintetiche in ospiti microbici si sta rivelando una strategia ideale per la produzione di nuovi antibiotici [41]. In un caso, Eustàquio e collaboratori hanno impiegato la metodologia della ricombinasi λ-Red per inattivare i geni *clo-hal* e *cloZ* nel gruppo di geni biosintetici che produce l'antibiotico clorobiocina, un inibitore della DNA girasi batterica. Il cosmide mutato recante la cassetta *clo-hal* inattivata o il gene *cloZ* è stato introdotto in *S. roseochromogenes* per studiare il ruolo funzionale di questi geni nella clorurazione della molecola. Inoltre, questo ceppo è stato utilizzato per produrre un analogo della clorobiocina, che presenta un gruppo metile al posto del cloro e ha mostrato una ridotta potenza antibiotica [42].

Il metodo di ricombinazione basato su λ-Red è stato applicato anche per la biosintesi combinatoria della daptomicina (Cubicin), un antibiotico approvato negli Stati Uniti per il trattamento delle infezioni cutanee causate dallo *Staphylococcus aureus* Gram-positivo [43]. L'antibiotico ha anche una potente attività battericida in vitro contro lo *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA), lo *Streptococcus pneumoniae* resistente alla penicillina (PRSP), gli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) e lo *S. aureus* resistente alla vancomicina (VRSA) [44]. Con l'emergere della resistenza batterica a questo antibiotico, c'è stato un interesse a creare derivati di seconda generazione della daptomicina. Con un approccio innovativo, la metodologia della ricombinasi λ-Red è stata utilizzata per scambiare moduli multipli nelle subunità della peptide sintetasi non ribosomiale (NRPS) nella via biosintetica della daptomicina, utilizzando *E. coli* come

ospite eterologo [45]. L'approccio di biosintesi combinatoria è stato utilizzato per generare una libreria di nuovi lipopeptidi con modifiche del peptide centrale, di cui alcuni composti sono risultati tanto attivi quanto la daptomicina. Questi esempi illustrano l'enorme potenziale degli strumenti di ingegneria del genoma batterico nella biosintesi di nuovi antibiotici.

10.2.3 SVILUPPO DI CEPPI VACCINALI ATTENUATI

Una delle strategie efficaci per prevenire le infezioni è l'uso della vaccinazione, che stabilisce una memoria immunologica di un agente estraneo innescando la risposta immunitaria innata dell'organismo. In passato, per difendersi dalle infezioni batteriche sono stati utilizzati con successo vaccini inattivati o attenuati rispetto all'agente patogeno reale. I vaccini vivi attenuati sono creati riducendo la virulenza dell'agente patogeno per indebolirne il potenziale infettivo senza compromettere la risposta immunitaria robusta dell'ospite, necessaria per proteggersi da future infezioni che potrebbero essere causate dallo stesso agente patogeno (ad esempio: MTBVAC contro *Mycobacterium tuberculosis* [46], Ty21a contro *Salmonella typhi* [47]). C'è una crescente attenzione all'uso della tecnologia del DNA ricombinante per produrre ceppi attenuati di batteri patogeni [48]. Gli strumenti di ingegneria del genoma vengono ora esplorati di routine per la possibilità di ridurre la virulenza batterica. Ad esempio, Ranallo e collaboratori hanno dimostrato con successo l'estensione del metodo di ricombinazione λ-Red in *Shigella* per lo sviluppo di ceppi vaccinali vivi [49]. Hanno utilizzato oltre 13 diversi ceppi isogenici per eliminare dei geni coinvolti in varie funzioni come la crescita intracellulare e la sopravvivenza *(asd)*, la diffusione da cellula a cellula (*virG*), l'invasione (*ipaB*), l'attività enterotossica (*set1A*, *sen*), per citarne alcune. Utilizzando un saggio delle placche, hanno determinato che il ceppo *virG* eliminato ha ridotto significativamente la formazione di placche. In ulteriori test di virulenza utilizzando il modello di cheratocongiuntivite (test di Sereny), hanno riscontrato che solo il ceppo *virG* eliminato era attenuato.

Più recentemente, Salehi e collaboratori hanno convalidato l'utilizzo di questa tecnica di ricombinazione per la produzione di ceppi vivi attenuati di *Shigella dysenteriae*, eliminando il gene *ipaD* [50]. L'ipaD è una proteina chaperonina e fa parte del sistema di secrezione di tipo III che secerne le proteine dell'antigene plasmidico di invasione (Ipas), responsabili della penetrazione e dell'invasione di *Shigella* nelle cellule epiteliali. Gli autori ipotizzano che la delezione del gene *ipaD* potrebbe potenzialmente inibire la secrezione delle proteine IpaD, IpaB e IpaC e quindi sopprimere l'invasione di *Shigella*.

La metodologia targetron è stata utilizzata anche per generare ceppi vaccinali candidati in agenti patogeni in cui il metodo di ricombinazione λ-Red funziona male. Combinando la metodologia targetron discussa in precedenza e il noto sistema di ricombinazione Cre-lox, è stato generato un ceppo vaccinale dell'agente patogeno Gram-positivo *Staphylococcus aureus* mediante un nuovo approccio chiamato Genome Editing via Targetrons and Recombinases (GETR) [37]. I ricercatori hanno generato degli introni in grado di integrare sequenze *lox* a monte e a valle dell'isola di patogenicità I (SaPI-1) di 15 kb dello *Staphylococcus aureus*. I siti *lox* sono sequenze specifiche di DNA che possono essere bersagliate dall'enzima Cre ricombinasi. L'espressione della Cre ricombinasi ha dato luogo a una ricombinazione Cre-mediata che ha eliminato la regione intermedia nel SaPI-1, portando alla generazione di un ceppo vaccinale. L'applicazione di queste tecniche in isolati clinici di *Staphylococcus* può essere molto utile per generare dei ceppi vaccinali per i ceppi MDR e vincere la sfida della resistenza agli antibiotici.

Anche se la sicurezza e l'efficacia di questi vaccini devono essere valutate periodicamente, gli esempi sopra riportati evidenziano il potenziale degli strumenti di editing del genoma per la progettazione di vaccini vivi. Lo sviluppo di vaccini promettenti e sicuri da usare avrà ampie applicazioni nell'assistenza sanitaria preventiva e sarà un trampolino di lancio per lo sviluppo di vaccini orali per altri batteri patogeni [51].

10.2.4 SPECIFICITÀ NELL'ABBATTIMENTO DEI PATOGENI E NELL'INDIVIDUAZIONE DEI PATOGENI PER LA DIAGNOSI

Gli strumenti adattati dai batteriofagi aiutano a comprendere le interazioni ospite-patogeno e servono come terapie mirate [52-54]. I fagi possono uccidere in modo specifico i ceppi virulenti di batteri che presentano un allineamento di sequenza molto vicino a quello dei ceppi innocui, grazie all'uso del sistema CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) /Cas9. Il sistema CRISPR/Cas9 mira specificamente a una sequenza di DNA per la formazione di una rottura a doppio filamento, con conseguente morte del batterio. I fagi possono fornire guide di RNA con proteine associate a CRISPR (Cas) ai batteri patogeni [55, 56].

Per quanto riguarda le terapie mirate contro i batteri patogeni, Citorik et al. hanno trovato degli antimicrobici specifici per la sequenza [55], che superano l'elevatissima somiglianza della sequenza genomica tra ceppi non patogeni e patogeni mirando a piccole variazioni di sequenza presenti nel ceppo patogeno. È possibile sfruttare la capacità dei Cas di colpire sequenze specifiche e di distinguere tra un solo mismatch tra il DNA genomico bersaglio e quello non bersaglio per uccidere la popolazione batterica patogena [55]. Nel modello delle larve *di Galleria mellonella*, le nucleasi mirate hanno mostrato una maggiore attività antimicrobica rispetto all'antibiotico cloramfenicolo. Le nucleasi a DNA guidate dall'RNA che hanno come bersaglio il gene di virulenza enteroemorragico di *E. coli* intimin e l'attività nucleasica su questo locus si sono dimostrate tossiche per i batteri patogeni [55].

In un'altra applicazione del sistema CRISPR, Yosef et al. hanno progettato un nuovo sistema CRISPR a due fagi, composto da un fago temperato e uno litico, programmato per sensibilizzare e uccidere in modo specifico i batteri resistenti agli antibiotici [57]. Inizialmente, è stato utilizzato un fago lisogeno che trasporta il macchinario CRISPR per indirizzare i geni di resistenza agli antibiotici e conferire la resistenza al fago litico a queste cellule. Le cellule sono diventate sensibili all'antibiotico ma resistenti al fago

litico. Nella seconda fase, il fago litico è stato utilizzato per uccidere le cellule resistenti agli antibiotici rimanenti, arricchendo così la popolazione di cellule sensibili agli antibiotici, che possono poi essere uccise con gli antibiotici. Gli autori propongono che questa strategia possa essere molto utile per il trattamento delle superfici ospedaliere o delle superfici cutanee del personale medico.

I fagi possono anche servire come strumenti diagnostici e di rilevamento delle infezioni, ma non richiedono l'amplificazione dei batteri ospiti, poiché la popolazione di fagi aumenta durante l'infezione. Quando il fago infetta batteri specifici, il template genomico del fago si arricchisce nella popolazione e i batteri bersaglio possono essere uccisi dal fago. Una PCR quantitativa successiva all'infezione fagica può indicare l'amplificazione del DNA fagico che infetta uno specifico batterio [53]. Esistono fagi diagnostici per batteri altamente patogeni, come il fago phi A1122 per *Yersinia pestis*, nonché sistemi fagici che segnalano *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* [58].

10.3 APPLICAZIONE DELLA BIOLOGIA SINTETICA PER COLPIRE LE INFEZIONI BATTERICHE

I principali progressi nell'ingegneria genomica di precisione hanno portato allo sviluppo di una serie di strumenti che si stanno rivelando estremamente preziosi per riprogettare la struttura del genoma microbico per applicazioni utili. Le strategie di ingegneria del genoma batterico discusse nelle sezioni precedenti illustrano chiaramente l'utilità di questi strumenti nelle applicazioni di biologia sintetica per colpire le malattie infettive. Oltre all'inserimento, alla delezione o alla mutazione di geni per modificare il genoma con strumenti di ingegneria, uno degli obiettivi principali dell'SB è quello di costruire e integrare circuiti genici che elaborano segnali all'interno di una cellula vivente per ottenere un risultato desiderato. I circuiti genici sono stati assemblati nei microbi utilizzando parti biologiche o unità funzionali per varie applicazioni biomediche [59, 60]. Le parti

biologiche modulari possono essere collegate per sviluppare dei circuiti basati su principi di ingegneria elettrica con risposte in ingresso e in uscita che possono essere analogiche o digitali. Con queste premesse ingegneristiche, l'SB potrebbe avere delle applicazioni nella produzione di biocarburanti, nella sintesi di sostanze chimiche industriali o di prodotti naturali sostitutivi, nelle tecnologie biomediche o nella comprensione e contrasto delle infezioni batteriche (Fig. 2a) [2, 5, 59]. Nella sezione che segue sono riportati alcuni esempi di componenti biologici regolatori utilizzati per applicazioni biomediche incentrate sulle infezioni batteriche.

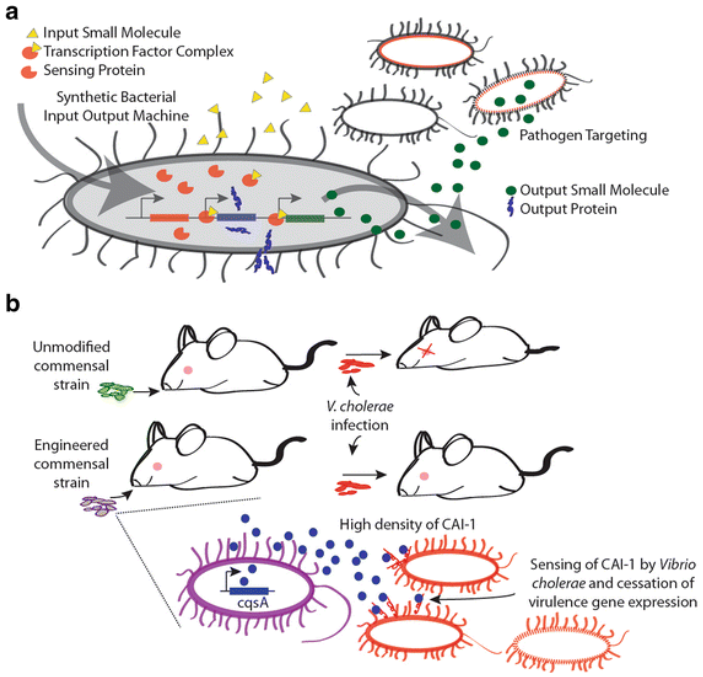


Figura 2. **a)** *I circuiti di biologia sintetica possono essere ingegnerizzati con i segnali di ingresso e di uscita desiderati per uccidere gli agenti patogeni batterici;* **b)** *L'ingegnerizzazione di batteri probiotici che esprimono la molecola QS Cholerae autoinducer-1 (CAI-1) per colpire l'infezione da Vibrio cholerae in un modello murino [65].* Immagine a grandezza naturale

10.3.1 CIRCUITI BASATI SUL QUORUM SENSING BATTERICO

I batteri percepiscono e rispondono efficacemente ai segnali ambientali come parte delle loro strategie naturali di sopravvivenza e proliferazione. Il SB ha sfruttato questi meccanismi per percepire e rispondere a segnali clinicamente rilevanti. Lo sviluppo e l'ingegnerizzazione di circuiti di SB basati su meccanismi di segnalazione di piccole molecole batteriche per colpire gli agenti patogeni batterici è stato utilizzato come approccio innovativo nella progettazione di circuiti.

Il comportamento dipendente dalla densità delle cellule batteriche, denominato quorum sensing (QS), è un circuito di segnalazione naturale altamente evoluto presente nei batteri [60]. Comporta la produzione di segnali di piccole molecole e il loro rilevamento da parte del batterio nativo attraverso i recettori di segnale che modulano l'espressione dei geni bersaglio [60]. L'ingegneria iniziale del circuito QS SB nei batteri è stata dimostrata da Weiss e Knight Jr. [61]. Uno dei sistemi QS di *Vibrio fischeri* si basa su una piccola molecola segnale chiave, l'N-acil-L-omoserina lattone (AHL), per la produzione di bioluminescenza. Nel loro primo circuito SB, la sintesi di AHL catalizzata da luxI (AHL sintasi) e il recettore del segnale AHL luxR sono stati ingegnerizzati in due popolazioni separate (rispettivamente popolazioni A e B) di *E. coli*. Quando questi ceppi sono stati coltivati in cocultura, si è osservato che i segnali AHL prodotti da *E. coli (luxI)* (popolazione A) diffondevano liberamente fuori dalla cellula e si legavano al suo recettore LuxR cognato nella sottopopolazione di *E. coli (luxR)* (popolazione B). Il complesso LuxR-AHL attivato ha a sua volta attivato la fusione promotore-rivelatore *luxI:gfp* con conseguente produzione di GFP [61]. A seguito di questa prima dimostrazione è aumentato l'interesse per l'utilità dei circuiti QS in SB in numerose applicazioni biomediche, tra cui strumenti diagnostici, cancro, malattie immunitarie, disturbi metabolici, terapie di malattie infettive, produzione di farmaci attraverso la fermentazione, biosensing, ecc [62-64].

In un esempio importante, Duan e March hanno dimostrato che l'alimentazione di topi neonati con *E. coli* probiotici ingegnerizzati per sovraesprimere in modo costitutivo il segnale QS di *Vibrio cholerae* (S)-3-idrossitridecan-4-one o l'autoinduttore-1 di Cholerae (CAI-1), che riduce la produzione di biofilm, ha aumentato in modo sostanziale il tasso di sopravvivenza dei topi alle infezioni da *V. cholerae* (92% con un pretrattamento di 8 ore) [65] (Fig. 2b). Utilizzando un circuito genico, Saeidi et al. hanno ingegnerizzato *E. coli* con il recettore AHL LasR *di P. aeruginosa* per percepire il segnale AHL di *P. aeruginosa* N- 3-oxo-dodeconoyl-L-HSL e autoregolare l'attivazione dei prodotti genici di uccisione e lisi (proteina di lisi E7 e Pyocin S5) che mirano a P. *aeruginosa* [66]. Insieme a questo progetto, altri circuiti QS per il targeting di agenti patogeni basati su moduli di rilevamento, distruzione e secrezione sono stati ingegnerizzati con successo in batteri utili. Ad esempio, in uno studio *proof-of-concept* è stata dimostrata l'eliminazione del patogeno *P. aeruginosa* utilizzando *E. coli* programmata che rileva il segnale QS di *P. aeruginosa* N-3-oxo-dodeconoyl-L -HSL e attiva la produzione e la secrezione della proteina chimerica letale batteriocina CoPy [67].

Un altro esempio di ingegneria modulare del circuito QS batterico è stato dimostrato programmando *E. coli* per cercare e uccidere *P. aeruginosa*. Questo sistema ha utilizzato CheZ, una proteina che promuove la motilità, e due proteine secernenti e killer ingegnerizzate, DNaseI e MicrocinS, che hanno promosso la rottura del biofilm e la letalità [68]. La maggior parte di questi circuiti QS si rivolge essenzialmente ai circuiti batterici Gram-negativi e in particolare solo alla classe AHL delle molecole QS. Esiste una grande diversità di molecole QS (classi non AHL) e di percorsi che rimangono ancora poco esplorati per il targeting e che possono essere efficacemente utilizzati per il controllo dei patogeni.

10.3.2 CIRCUITI A BASE DI RNA

Anche le parti biologiche a base di RNA, chiamate riborego-latori, stanno guadagnando attenzione nella progettazione di cir-

cuiti SB grazie alla loro natura sintonizzabile e modulare. Questi strumenti a forcina di RNA sono progettati per sequestrare il sito di legame del ribosoma (RBS) a monte del sito di inizio dell'mRNA che codifica un gene, al fine di bloccare la traduzione [58, 69-72]. In un'applicazione di questi strumenti, gli interruttori a RNA chiamati "*toehold*" sviluppati da Pardee et al. sono stati utilizzati per applicazioni diagnostiche in vitro, senza cellule e su carta, per rilevare l'mRNA di Ebola e gli mRNA dei geni di resistenza agli antibiotici [73]. La rete genica diagnostica basata sull'RNA è costituita da una rete di geni reporter (*gfp*, *lacZ*), in cui la RBS è sequestrata a monte dall'interruttore *toehold*. La rete genica e un sistema di trascrizione/traduzione accoppiato senza cellule sono liofilizzati su carta o altro materiale poroso e possono essere attivati mediante reidratazione con il campione da analizzare, costituito dall'mRNA da rilevare. I sensori di RNA messaggero per i geni di resistenza agli antibiotici, dopo aver rilevato il gene bersaglio, hanno mostrato una significativa induzione del gene reporter, rendendo questo strumento molto promettente ed economico per il rilevamento e la diagnosi di infezioni batteriche in campioni clinici.

Oltre all'applicazione nella diagnostica, la capacità di regolazione fine dell'espressione genica e la natura modulare dei riboregolatori li rendono ottimi candidati per le integrazioni cromosomiche utilizzando gli strumenti di editing del genoma esistenti per l'ingegneria delle vie biosintetiche negli ospiti batterici. È evidente da questi esempi che l'ingegneria del genoma e gli strumenti di biologia sintetica nei batteri possono avere un impatto significativo su una serie di applicazioni per colpire le infezioni batteriche (Fig. 3).

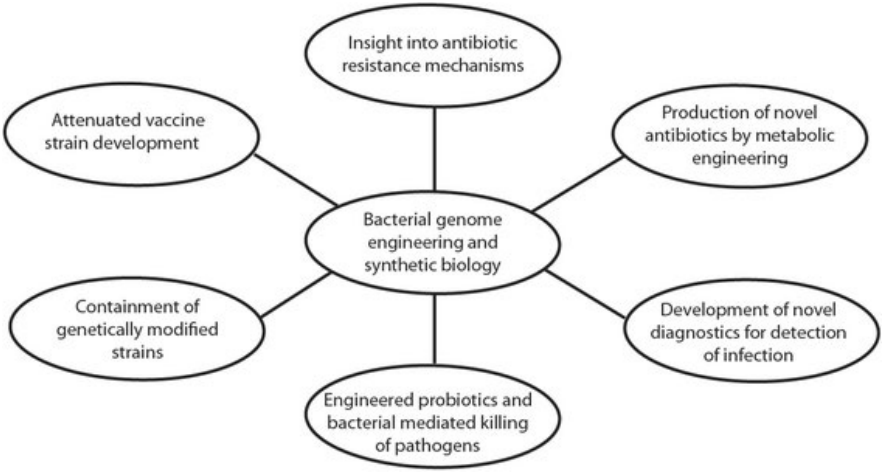


Figura 3. *L'uso di strumenti di SB e di ingegneria genomica per contrastare le infezioni batteriche.* Immagine a grandezza naturale

10.4 CONCLUSIONI

L'integrazione dei principi dell'ingegneria e della biologia nell'ultimo decennio ha aperto nuove strade per lo sviluppo di farmaci per il trattamento delle malattie. Il rapido emergere della resistenza antimicrobica batterica e i limitati successi nell'identificazione di nuovi antibiotici rendono importante l'identificazione e la validazione di nuovi bersagli farmacologici batterici. Le tecniche di editing del genoma guidate da SB offrono nuove strade per perseguire l'identificazione di bersagli batterici e presentano la possibilità di sviluppare nuovi terapeutici antimicrobici. La disponibilità di strumenti di editing del genoma batterico ad alto rendimento e i progressi delle tecnologie di sintesi del DNA offrono nuove opportunità per l'ingegneria metabolica di grandi gruppi di geni negli ospiti microbici. Grazie alla combinazione oculata di parti di geni, la biosintesi può essere potenzialmente riprogrammata per la generazione a scopo terapeutico di nuove, piccole molecole [48]. Ciò è ulteriormente facilitato dall'estra-

zione *in silico* dell'intero genoma e dagli algoritmi software che predicono i gruppi di geni che possono essere utilizzati nell'ingegneria delle vie biosintetiche per la produzione di nuovi antibiotici [48, 74]. Ciò offre un enorme potenziale per la biosintesi combinatoria di analoghi di prodotti naturali per la scoperta di nuovi antibiotici, come nell'esempio dell'antibiotico daptomicina descritto nella sezione precedente [41].

Oltre agli antibiotici, è fondamentale per la lotta contro le infezioni lo sviluppo di alternative terapeutiche che impiegano batteriofagi e ingegneria batterica probiotica per il targeting e la distruzione dei patogeni, compresi i patogeni batterici resistenti ai farmaci. I progressi nella progettazione computazionale di circuiti genici, uniti ai miglioramenti nella sintesi del DNA su larga scala, preannunciano una nuova era di approcci terapeutici basati su SB. È ora possibile progettare interi genomi batterici a partire da componenti sintetizzati. Considerando il codice genetico come un analogo del software del computer, è possibile "avviare" il genoma sintetico in un ambiente cellulare compatibile [75]. Inoltre, la progettazione computazionale di circuiti sintetici sarà molto utile per prevedere la combinazione ottimale di parti sintetiche per una funzione cellulare desiderata. Recentemente, Voigt e collaboratori hanno sviluppato il software Cello, che consente all'utente di programmare una funzione circuitale desiderata in *E. coli* e di compilare il codice in una sequenza di DNA per la sintesi [76]. La progettazione assistita da computer (CAD), la sintesi di DNA ad alta produttività e le tecniche avanzate di editing del genoma si riveleranno estremamente utili per generare ceppi batterici riprogrammati per applicazioni terapeutiche. La combinazione di metodi computazionali avanzati per sistemi di SB predittivi e il rapido progresso delle tecnologie per la sintesi efficiente del DNA su larga scala e per l'ingegneria del genoma automatizzata e ad alto rendimento, come MAGE e pORTMAGE, indica che la SB ha un immenso potenziale per fornire nuove soluzioni per il controllo dei patogeni.

I batteri geneticamente modificati offrono grandi speranze di trovare nuove soluzioni per individuare e trattare le infezio-

ni. Tuttavia, è anche indispensabile valutare periodicamente la biosicurezza di questi organismi per evitare il rilascio accidentale di batteri sintetici generati in alcune di queste applicazioni. Per risolvere questo problema, Collins e colleghi hanno sviluppato due sistemi di salvaguardia ingegnerizzati in *E. coli*, chiamati "Deadman" e "Passcode". Questi interruttori si basano su circuiti che necessitano di input specifici di piccole molecole per la sopravvivenza della cellula. In assenza o in presenza delle molecole specifiche, viene attivata l'espressione del gene della tossina che porta alla morte cellulare. I circuiti di kill switch possono essere potenzialmente incorporati in un'ampia gamma di ospiti batterici per garantire una manipolazione sicura di questi organismi modificati. Dagli esempi sopra riportati risulta chiaramente che l'SB sta colmando il divario tra la ricerca di base e quella traslazionale. Si prevede che con i continui progressi tecnologici in questo campo e con lo sviluppo di nuovi strumenti biologici programmabili, SB ha un enorme potenziale per sviluppare terapie biomediche per prevenire e curare le malattie causate dalle infezioni batteriche.

ABBREVIAZIONI

- AHL: N-acil-L-omoserina lattone
- CAI-1: Autoinduttore-1 di Cholerae
- CDC: Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie
- CRISPR: sequenze ripetute palindrome brevi raggruppate a intervalli regolari (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
- DNA: Acido desossiribonucleico
- GETR: Editing del genoma tramite targetron e ricombinasi
- GFP: Proteina verde fluorescente
- iNOS: ossido nitrico sintasi inducibile
- MAGAZZINO: Ingegneria del genoma automatizzata in multiplex
- mBTL: meta-bromo-tiolattone
- MDR: Resistente ai farmaci
- mRNA: acido ribonucleico messaggero
- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina
- NO: Ossido nitrico
- NRPS: Peptidi nonribosomiali sintetasi
- PCR: Reazione a catena della polimerasi
- pORTMAGE: ingegneria del genoma automatizzata multiplex portatile
- PRSP: *Streptococcus pneumoniae* resistente alla penicillina
- QS: Rilevamento del quorum
- RBS: Sito di legame ribosomiale
- RNA: Acido ribonucleico
- SB: Biologia sintetica
- VRE: Enterococchi resistenti alla vancomicina
- VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente alla vancomicina
- OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità

LE FONTI DI QUESTO NUMERO

1. Sawa, T., Kooguchi, K. & Moriyama, K. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. j intensive care 8, 13 (2020). https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6
Tratto da: Journal of Intensive Care. È una rivista ad accesso libero che comprende tutti gli aspetti della medicina intensiva, come la terapia intensiva e critica, la terapia intensiva traumatologica e chirurgica, la terapia intensiva pediatrica, la medicina per acuti e d'emergenza, la medicina perioperatoria, la rianimazione, il controllo delle infezioni e le disfunzioni d'organo.

2. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha C-J, Jeong BC and Lee SH (2017) Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055
Tratto da: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. È una rivista multidisciplinare ad accesso libero che comprende ricerche su batteri, funghi, parassiti, virus, endosimbionti, prioni e tutti i patogeni microbici, nonché sul microbiota e sul suo effetto sulla salute e sulle malattie in vari ospiti. Gli approcci di ricerca includono la microbiologia molecolare, la microbiologia cellulare, la regolazione genica, la proteomica, la trasduzione del segnale, l'evoluzione patogena, la genomica, la biologia strutturale, i fattori di virulenza e gli ospiti modello.

3. Krishnamurthy, M., Moore, R.T., Rajamani, S. et al. Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens. BMC Microbiol 16, 258 (2016). https://doi.org/10.1186/s12866-016-0876-3
Tratto da: BMC Microbiology. BMC Microbiology è una rivista ad accesso aperto e peer-reviewed che prende in considerazione

articoli su tutti i microrganismi – batteri, archei, alghe e funghi, virus, parassiti unicellulari ed elminti. Prende in considerazione studi su tutti gli aspetti della biologia e della biochimica dei microrganismi, compresi, ma non solo, la biologia cellulare, la genomica, la segnalazione, l'interazione dei microbi con l'ambiente e l'ospite, gli approfondimenti meccanicistici e funzionali sulle infezioni e le malattie e le applicazioni biotecnologiche nella scienza e nell'industria.

4. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020; 17(17):6278. https://doi.org/10.3390/ijerph17176278

Tratto da: International Journal of Environmental Research and Public Health. È una rivista interdisciplinare, peer-reviewed, open access, pubblicata semestralmente online da MDPI. Si occupa di scienze ambientali e ingegneria, salute pubblica, salute ambientale, igiene del lavoro, economia sanitaria e ricerca sulla salute globale.

5. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens. 2021; 10(10):1310. https://doi.org/10.3390/pathogens10101310

Tratto da: Pathogens. Pathogens pubblica recensioni, articoli di ricerca regolari e comunicazioni su tutti gli aspetti dei patogeni e delle interazioni patogeno-ospite. Non ci sono restrizioni sulla lunghezza massima degli articoli. L'obiettivo è incoraggiare gli scienziati a pubblicare le loro ricerche sperimentali e teoriche nel modo più dettagliato possibile.

6. Aljeldah MM. Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. Antibiotics. 2022; 11(8):1082. https://doi.org/10.3390/antibiotics11081082

Tratto da: Antibiotics. Antibiotics è una rivista ad accesso aperto e peer review su tutti gli aspetti degli antibiotici. Comprende i

campi generali della biochimica, della chimica, della genetica, della microbiologia e della farmacologia. Il suo principale obiettivo è incoraggiare gli scienziati a pubblicare i loro risultati sperimentali e teorici nel modo più dettagliato possibile, dunque non ci sono restrizioni sulla lunghezza massima degli articoli.

7. Varela MF, Stephen J, Lekshmi M, Ojha M, Wenzel N, Sanford LM, Hernandez AJ, Parvathi A, Kumar SH. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. Antibiotics. 2021; 10(5):593. https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593
Tratto da: Antibiotics. Antibiotics è una rivista ad accesso aperto e peer review su tutti gli aspetti degli antibiotici. Comprende i campi generali della biochimica, della chimica, della genetica, della microbiologia e della farmacologia. Il suo principale obiettivo è incoraggiare gli scienziati a pubblicare i loro risultati sperimentali e teorici nel modo più dettagliato possibile, dunque non ci sono restrizioni sulla lunghezza massima degli articoli.

8. Behzadi, P.; Baráth, Z.; Gajdács, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Antibiotics 2021, 10, 42. https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042
Tratto da: Antibiotics. Antibiotics è una rivista ad accesso aperto e peer review su tutti gli aspetti degli antibiotici. Comprende i campi generali della biochimica, della chimica, della genetica, della microbiologia e della farmacologia. Il suo principale obiettivo è incoraggiare gli scienziati a pubblicare i loro risultati sperimentali e teorici nel modo più dettagliato possibile, dunque non ci sono restrizioni sulla lunghezza massima degli articoli.

9. Kahlmeter G. (2014). Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. Upsala journal of medical sciences, 119(2), 78–86. https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901446

Tratto da: Upsala Journal of Medical Sciences. È una rivista internazionale Open Access, peer review, pubblicata e finanziata dalla Upsala Medical Society. Viene pubblicata dal 1865, è una delle più antiche riviste mediche svedesi e pubblica lavori originali clinici e sperimentali in campo medico.

10. Velazquez-Meza, M. E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. Veterinary world, 15(3), 743–749. https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749

Tratto da: Veterinary World. Pubblica articoli di alta qualità incentrati sulle scienze veterinarie e animali. I campi di studio sono la batteriologia, la parassitologia, la patologia, la virologia, l'immunologia, la micologia, la salute pubblica, la biotecnologia, la scienza della carne, le malattie dei pesci, la nutrizione, la ginecologia, la genetica, la fauna selvatica, gli animali da laboratorio, i modelli animali di infezioni umane, le malattie da prioni e l'epidemiologia.