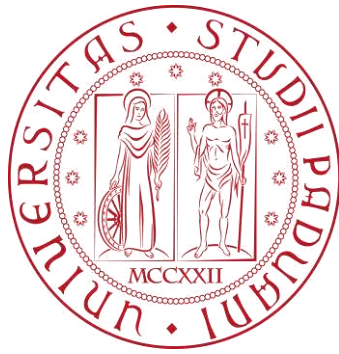




Università degli Studi di Padova

Scuola di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Scienze
Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica

TESI DI LAUREA

**L'antibiotico-resistenza come fenomeno evolutivo:
origine, diffusione e approcci innovativi
di contenimento**

Relatore Prof. Fabio Zampieri

Laureanda Chiara Dal Cero

Anno Accademico 2025/2026

*“Considerate la vostra semenza:
fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza”*

Dante Alighieri

Indice

Riassunto	1
Abstract	3
Introduzione	5
1 Gli antibiotici	7
1.1 Definizione	7
1.2 Principali classi di antibiotici	8
1.2.1 Antibiotici inibitori della sintesi della parete cellulare o interferenti con la membrana plasmatica	8
1.2.2 Inibitori della sintesi proteica	10
1.2.3 Inibitori della sintesi degli acidi nucleici	11
1.2.4 Spettro antibatterico	12
1.3 Storia degli antibiotici	13
2 L'antibiotico-resistenza	19
2.1 Definizione e epidemiologia	19
2.2 Specie batteriche resistenti	21
2.3 Antibiotico-resistenza verso molteplici farmaci	25
2.4 Antimicrobico-resistenza	26
2.5 Il legame tra l'antibiotico-resistenza e l'assistenza sanitaria	27
3 I meccanismi dell'antibiotico-resistenza	29
3.1 Visione generale dei diversi meccanismi di resistenza	29
3.2 Riduzione della permeabilità al farmaco	29
3.3 Pompe di efflusso	31
3.3.1 Pompe di efflusso e resistenza multifarmaco	32

3.4	Alterazione, modifica e protezione del target	33
3.5	Inattivazione o modifica del farmaco	35
3.5.1	Inattivazione degli aminoglicosidi	35
3.5.2	Inattivazione dei beta-lattamici	35
3.6	Bypass del target	36
3.7	Meccanismi di resistenza nelle diverse classi di antibiotici	36
3.8	Combinazione di più meccanismi di resistenza e ruolo delle pompe di efflusso	39
4	Come emerge l'antibiotico-resistenza	41
4.1	Storia dell'antibiotico-resistenza	41
4.2	Antibiotico-resistenza intrinseca, acquisita e adattativa	44
4.3	Emergenza e acquisizione dei meccanismi di resistenza	45
4.3.1	Resistenza acquisita: resistenza mutazionale	45
4.3.2	Resistenza acquisita: trasferimento genico orizzontale	49
4.3.3	Resistenza adattativa	50
4.4	Ruolo dell'ambiente e delle interazioni tra microrganismi	51
4.4.1	Protezione reciproca tra microrganismi e relativa funzione in un'ot- tica evolutiva	53
5	Rapporto tra antibiotico-resistenza ed evoluzione: meccanismi evolutivi influenzanti il mantenimento delle resistenze	55
5.1	Impatto delle mutazioni di resistenza sulla fitness	55
5.1.1	Il costo della resistenza	56
5.2	Le mutazioni compensatorie	58
5.2.1	Evidenze sperimentali sulla mitigazione del costo delle mutazioni di resistenza	61
5.2.2	Implicazioni riguardanti la corretta durata di un trattamento an- tibiotico	61
5.3	Traiettorie evolutive e modelli	62
5.4	Differenze <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>	64
5.4.1	Sopravvivenza dei ceppi sensibili al trattamento	65
5.4.2	Le mutazioni compensatorie: una soluzione imperfetta	66
5.5	Ruolo evolutivo del trasferimento genico orizzontale	67
6	Discussione. Approcci innovativi e soluzioni alternative al fenomeno dell'antibiotico-resistenza	71
6.1	Approccio <i>One Health</i>	71

6.1.1	Uso degli antimicrobici in umani, animali e piante	72
6.1.2	L'approccio <i>One Health</i> per contrastare l'antimicrobico-resistenza .	73
6.2	<i>Antimicrobial stewardship</i>	74
6.3	Antimicrobici non convenzionali	75
6.3.1	Oligonucleotidi antisense	75
6.3.2	Batteriofagi	76
6.3.3	Microbiota	78
6.4	<i>Traditional Medicine Strategy</i>	78
6.4.1	Medicina tradizionale e premio Nobel: il caso di Tu Youyou per la cura della malaria	79
6.4.2	Considerazioni sulla medicina tradizionale	80
6.5	Intelligenza artificiale	81
Conclusioni		83
Bibliografia		85
Allegato 1		95

Elenco delle figure

1.1	Tipi di beta-lattamici, tratta da Dickson <i>et al.</i> , 2013.	9
2.1	DALYs per 100 000 abitanti nel 2020, adattata da ECDC (2022).	20
2.2	Morti associate e attribuibili all'ABR, per 100 000 abitanti, tratta da Murray <i>et al.</i> , (2022).	21
2.3	Percentuale di resistenza delle principali combinazioni patogeno/antibiotico. Italia, 2015-2023, tratta dal report ISS (2024).	23
2.4	Numero di morti globali attribuibili e associate all'antibiotico-resistenza per patogeno, tratta da Murray <i>et al.</i> , (2022).	24
3.1	Panoramica dei meccanismi di antibiotico-resistenza, tratta da Darby, 2023.	30
3.2	Meccanismo di resistenza alla colistina, tratta da Liu <i>et al.</i> , 2024.	34
5.1	Relazione tra fitness iniziale e aumento della fitness, tratta da Couce <i>et al.</i> , (2015).	60
5.2	Relazione tra fitness e resistenza, tratta da Hughes <i>et al.</i> (2017).	63
5.3	Fitness dei ceppi resistenti rispetto a quelli sensibili, in assenza di antibiotico secondo diversi studi, tratta da MacLean <i>et al.</i> (2015).	66

Elenco delle tabelle

1.1	Consumo comunitario di antibatterici per uso sistemico, Paesi UE e SEE, 2019-2023 (espresso come DDD per 1.000 abitanti al giorno). Aifa, 2024. .	17
3.1	Meccanismi di resistenza nelle diverse classi di antibiotici, adattata Davies <i>et al.</i> , 2010.	38

Riassunto

L'antibiotico-resistenza rappresenta una delle principali minacce per la salute pubblica globale, configurandosi come un fenomeno biologico ed evolutivo complesso. La presente tesi analizza il fenomeno dell'antibiotico-resistenza approfondendone l'origine, i meccanismi molecolari, le dinamiche evolutive e le possibili strategie di contenimento.

Particolare rilievo viene attribuito alla relazione tra antibiotico-resistenza ed evoluzione biologica, considerando la resistenza come un esempio concreto e osservabile di evoluzione in tempo reale, guidata dalla selezione naturale. In questo contesto vengono esaminati il costo in termini di fitness associato alle mutazioni di resistenza, il ruolo delle mutazioni compensatorie e le traiettorie evolutive che consentono il mantenimento dei ceppi resistenti anche in assenza di pressione antibiotica.

Infine, la tesi affronta le principali strategie di contrasto all'antibiotico-resistenza, evidenziando l'importanza dell'approccio *One Health*, dei programmi di *Antimicrobial Stewardship* e dello sviluppo di antimicrobici innovativi. Sono inoltre considerate le potenzialità offerte dalla medicina tradizionale e dall'intelligenza artificiale nella ricerca di nuove soluzioni terapeutiche e preventive.

Al fine di affrontare al meglio il problema, infatti, l'antibiotico-resistenza va vista non solo come una sfida clinica, ma anche come un fenomeno evolutivo dinamico che richiede un approccio multidisciplinare e globale.

Dal punto di vista del metodo, è stata condotta una *review* narrativa della letteratura scientifica, senza restrizioni di anno di pubblicazione, incentrata su temi di biologia evolutiva, antibiotico-resistenza e loro applicazione clinica. È stata data priorità agli studi clinici randomizzati, alle meta-analisi e alle linee guida nazionali e internazionali più recenti.

Abstract

Antibiotic resistance represents one of the major threats to global public health, constituting a complex biological and evolutionary phenomenon. This thesis analyzes the phenomenon of antibiotic resistance by exploring its origins, molecular mechanisms, evolutionary dynamics, and possible containment strategies.

Particular emphasis is placed on the relationship between antibiotic resistance and biological evolution, considering resistance as a concrete and observable example of evolution in real time driven by natural selection. In this context, the fitness cost associated with resistance mutations, the role of compensatory mutations and the evolutionary trajectories that allow resistant strains to persist even in the absence of antibiotic pressure are examined.

Finally, the thesis addresses the main strategies for combating antibiotic resistance, highlighting the importance of the One Health approach, Antimicrobial Stewardship programs, and the development of innovative antimicrobials. The potential contributions of traditional medicine and artificial intelligence in the search for new therapeutic and preventive solutions are also considered.

In order to address the issue effectively, antibiotic resistance must be regarded not only as a clinical challenge, but also as a dynamic evolutionary phenomenon requiring a multidisciplinary and global approach.

From a methodological perspective, a narrative review of the scientific literature was conducted without restrictions on publication date, focusing on topics in evolutionary biology, antibiotic resistance, and their clinical applications. Priority was given to randomized clinical trials, meta-analyses, and the most recent national and international clinical guidelines.

Introduzione

Nel 2019 l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha dichiarato che la resistenza antimicrobica è una delle 10 principali minacce per la salute pubblica a livello mondiale cui deve far fronte l'umanità. Nel luglio 2022 la Commissione Europea e gli Stati membri hanno individuato nella resistenza antimicrobica una delle tre principali minacce sanitarie prioritarie, responsabile di 1,27 milioni di morti all'anno nel mondo (European Commission, Health Emergency Preparedness and Response Authority (HERA), 2022). La diffusione di batteri resistenti compromette infatti l'efficacia delle terapie antibiotiche, aumentando il rischio di infezioni difficili o impossibili da trattare, con conseguente incremento della mortalità, della durata delle ospedalizzazioni e dei costi sanitari. Il fenomeno interessa sia l'ambito ospedaliero sia quello comunitario, con una crescente diffusione di ceppi multi-resistenti responsabili di infezioni respiratorie, urinarie, ematiche e nosocomiali.

La resistenza antimicrobica non è tuttavia un fenomeno nuovo, caratteristico solo dell'ultimo secolo, ma dalle evidenze in seguito trattate emerge come essa sia sempre stata presente parallelamente all'esistenza dei composti antimicrobici. È tuttavia l'ingente pressione selettiva data dall'uso massiccio di questi farmaci che ha costituito il principale determinante di questa emergenza sanitaria, creando le condizioni favorevoli alla sopravvivenza e riproduzione dei ceppi dotati di caratteristiche di resistenza. L'esposizione agli antibiotici esercita infatti una forte pressione selettiva sulle popolazioni batteriche, favorendo la sopravvivenza e la diffusione dei microrganismi che possiedono mutazioni o geni in grado di conferire resistenza. Attraverso il meccanismo della selezione naturale, i ceppi sensibili vengono progressivamente eliminati, mentre quelli resistenti acquisiscono un vantaggio adattativo e tendono a predominare.

L'evoluzione della resistenza non dipende soltanto dall'insorgenza casuale di mutazioni genetiche, ma anche dalla capacità dei batteri di scambiarsi materiale genetico tramite trasferimento genico orizzontale, permettendo una rapida diffusione dei geni di resistenza anche tra specie differenti. Questo rende l'antibiotico-resistenza un fenomeno dinamico

e altamente adattativo.

Nell'affrontare lo sviluppo di nuove strategie risulta essere utile e rilevante considerare l'antimicrobico-resistenza come un fenomeno evolutivo, ovvero come un prodotto dell'evoluzione, che agisce su tutti i viventi. Tramite l'analisi dei meccanismi dell'evoluzione e della selezione naturale possono infatti emergere importanti considerazioni e riflessioni, applicabili anche nella ricerca per la risoluzione di questo fenomeno. È fondamentale quindi un approccio multidisciplinare, non limitato al solo piano clinico ma basato anche sullo studio dei meccanismi molecolari e evolutivi che sono alla base di questa emergenza sanitaria.

Capitolo 1

Gli antibiotici

1.1 Definizione

Con antibatterico si intende un composto in grado di uccidere i batteri o di prevenire la loro moltiplicazione (Agenzia Italiana del Farmaco, 2018). Fu il biologo francese Paul Vuillemin, descrivendo l'azione antagonista esistente tra organismi viventi, a coniare nel 1889 il termine antibiosi (antagonismo biotico) dalla fusione di due parole greche: *anti*, contro, e *bios*, vita, da cui derivò, poi, il termine di antibiotico (Tamburello *et al.*, 2017). Esistono due tipologie di composti antibatterici:

- Gli antibiotici, sostanze prodotte naturalmente da microrganismi e capaci di agire su altri microrganismi (o su cellule viventi) inibendone la crescita o distruggendoli (Treccani, 2025).
- I chemioterapici, ovvero composti di sintesi.

I composti antibatterici si possono quindi distinguere sulla base della loro origine, ottenendo così gli antibiotici, sostanze di origine naturale prodotte come metaboliti secondari da varie specie di funghi e batteri, e i chemioterapici, ottenuti per sintesi chimica. Esistono poi antibiotici semi-sintetici, ottenuti a seguito della modificazione strutturale degli antibiotici naturali per migliorarne le caratteristiche antibatteriche o farmacologiche. Questa distinzione basata sull'origine ora non è più molto utilizzata nel mondo scientifico e si preferisce utilizzare genericamente il termine “antibiotico” per intendere i composti con azione antibatterica. Questo stesso approccio verrà utilizzato in questo lavoro d'ora in poi. Al di là della loro origine, una distinzione più frequentemente usata è quella basata sul risultato ottenuto dal loro uso. Si hanno quindi:

- Gli antibiotici batteriostatici, che bloccano la riproduzione dei batteri, inibendone la crescita senza ucciderli. In questo modo è favorita l'eliminazione da parte del sistema immunitario.
- Gli antibiotici battericidi, che ne provocano la morte. Si definisce battericida l'antibiotico che dopo 24 ore di contatto in vitro determina una sopravvivenza uguale o inferiore allo 0.01% (Murray *et al.*, 2021).

Per valutare se un antibiotico è batteriostatico o battericida si utilizzano due parametri, la M.I.C e la M.B.C. Con M.I.C si intende la Minima Concentrazione Inibente (in inglese, *Minimal Inhibitory Concentration*), ovvero la concentrazione antibiotica più bassa in grado di inibire la crescita dei batteri. La M.B.C, cioè Minima Concentrazione Battericida (in inglese, *Minimal Bactericidal Concentration*) corrisponde alla concentrazione antibiotica più bassa in grado di uccidere il 99.9% della popolazione batterica. Il fatto che un antibiotico sia batteriostatico o battericida deriva principalmente dal suo meccanismo di azione, ovvero dal fatto che colpisca dei target indispensabili per la sopravvivenza batterica, nel caso degli antibiotici battericidi, oppure, al contrario, colpisca dei target necessari alla sola replicazione, cosa che accade per gli antibiotici batteriostatici.

Gli antibiotici possono essere quindi classificati sulla base delle strutture che colpiscono: si avranno gli antibiotici interferenti con la sintesi della parete batterica, quelli inibenti la sintesi proteica e quelli contrastanti la sintesi degli acidi nucleici.

1.2 Principali classi di antibiotici

1.2.1 Antibiotici inibitori della sintesi della parete cellulare o interferenti con la membrana plasmatica

L'inibizione della sintesi della parete cellulare rappresenta il più comune meccanismo di azione degli antibiotici e infatti è proprio dei beta-lattamici, della vancomicina, della bacitracina e di alcuni farmaci agenti contro i micobatteri come l'isoniazide e l'etambutolo.

Beta-lattamici

I beta-lattamici sono chiamati in questo modo per la loro struttura chimica, contenente un anello beta-lattamico. Nella cellula batterica il bersaglio di questi antibiotici è costituito da degli enzimi detti serina proteasi (denominati anche proteine leganti la penicillina, PBP) che sono deputati alla costruzione di alcuni legami tra le molecole di *N*-acetilglucosamina e acido *N*-acetilmuramico a livello dello strato di peptidoglicano

costituente la parete delle cellule batteriche. Questa classe di antibiotici lega le PBP nella parete batterica e impedisce la formazione di legami crociati tra le catene del peptidoglicano. I beta-lattamici hanno generalmente proprietà battericide poiché la mancanza della parete cellulare, data anche dalla attivazione di autolisine che degradano la parete cellulare alterata, causa la morte della cellula batterica. Tra gli antibiotici appartenenti a questa classe si ricordano le penicilline, le cefalosporine, i carbapenemi e i monobattamici.

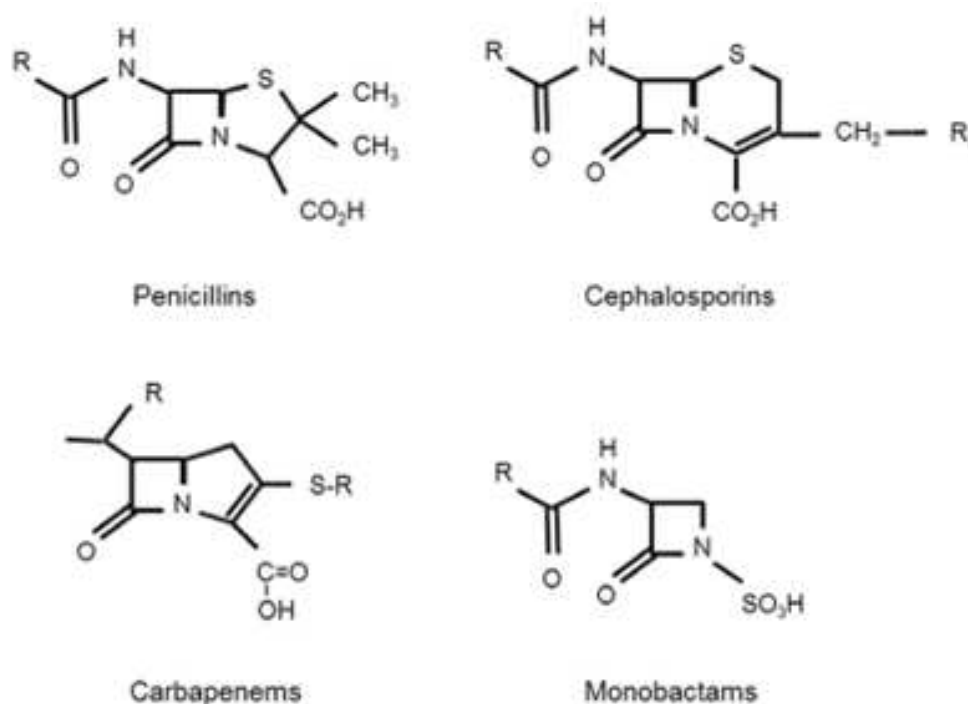


Figura 1.1: Tipi di beta-lattamici, tratta da Dickson *et al.*, 2013.

Glicopeptidi

Il glicopeptide più utilizzato è la vancomicina, che agisce interferendo stericamente con la formazione dei ponti tra le catene del peptidoglicano. Infatti interagisce con la sequenza D-alanina-D-alanina terminale delle catene laterali, modificando così la struttura del peptidoglicano e impedendo l'azione degli enzimi deputati alla sua polimerizzazione.

Lipopeptidi

Un antibiotico appartenente a questa classe è la daptomicina, che non è un inibitore della sintesi della parete cellulare poiché agisce su un altro target, infatti lega la membrana

citoplasmatica batterica e ne causa la depolarizzazione. In questo modo si ha la distruzione dei gradienti ionici tra i due lati della membrana con conseguente morte cellulare. È quindi un antibiotico battericida.

Poliipeptidi

La bacitracina è un inibitore della sintesi della parete cellulare che interferisce con il passaggio dei precursori del peptidoglicano dalla membrana plasmatica alla parete cellulare. Altri meccanismi di azione sono il danneggiamento della membrana citoplasmatica e l'inibizione della trascrizione dell'RNA. Le polimixine invece causano la morte della cellula batterica alterando la permeabilità della membrana. Infatti si inseriscono nella membrana come detergenti, interferendo con lipopolisaccaridi e fosfolipidi.

Isoniazide, Etionamide, Etambutolo e Cicloserina

Sono antibiotici utilizzati per il trattamento delle infezioni da micobatteri: isoniazide e etionamide bloccano la sintesi degli acidi micolici, che sono i componenti peculiari della parete di questo tipo di batteri, mentre l'etambutolo e la cicloserina agiscono sempre interferendo con la sintesi della parete cellulare, ma con altri meccanismi.

1.2.2 Inibitori della sintesi proteica

Tra gli antibiotici più utilizzati appartenenti a questa classe si trovano gli aminoglicosidi, le tetracicline, gli ossazolidinoni, il cloramfenicolo, i macrolidi e la clindamicina, più altri meno usati in pratica clinica.

Aminoglicosidi

Sono antibiotici che inibiscono la sintesi proteica legando irreversibilmente le proteine della subunità ribosomiale 30S. Di conseguenza si ha l'errata lettura dell'RNA messaggero, il rilascio prematuro dei ribosomi dall'mRNA, l'arresto della sintesi proteica e quindi la produzione di proteine aberranti. Hanno pertanto azione battericida. I più noti sono la streptomycin, la kanamicina, la gentamicina e la tobramicina, oltre che l'amikacina.

Tetracicline

Questi antibiotici si legano reversibilmente alle subunità ribosomiali 30S, inibendo la sintesi proteica con effetto batteriostatico. Le più utilizzate sono la tetraciclina, la doxiciclina e la minociclina.

Ossazolidinoni

L'antibiotico più utilizzato appartenente a questa classe è il linezolid, che agisce bloccando l'inizio della sintesi proteica interferendo con la formazione del complesso tRNA- mRNA-ribosoma, tramite il legame alla subunità 50S del ribosoma.

Cloramfenicolo

Anche questo antibiotico si lega alla subunità 50S del ribosoma batterico, in particolare alla componente peptidil-transferasica, e così facendo blocca l'allungamento del peptide.

Macrolidi e Clindamicina

Appartengono alla classe dei macrolidi l'eritromicina, l'azitromicina e la claritromicina: sono tutti antibiotici che agiscono legando reversibilmente l'RNA ribosomiale 23S della subunità ribosomiale 50S. L'effetto finale è quello del blocco dell'elongazione del peptide. Anche la clindamicina agisce in modo simile, legando il ribosoma 50S e bloccando l'elongazione.

1.2.3 Inibitori della sintesi degli acidi nucleici

Appartengono a questa classe di antibiotici i chinoloni, la rifampicina, la rifabutina e il metronidazolo. Esistono poi gli antimetaboliti, come i sulfamidici e il trimetoprim.

Chinoloni

Questi farmaci sono dei chemioterapici di sintesi che inibiscono alcuni enzimi necessari per la replicazione, la ricombinazione e la riparazione del DNA, ovvero la topoisomerasi batterica di tipo II (detta anche girasi) e la topoisomerasi di tipo IV. I più utilizzati sono la levofloxacin, la ciprofloxacina e la moxifloxacina.

Rifampicina e Rifabutina

Questi antibiotici agiscono in modo simile, legando l'RNA polimerasi DNA-dipendente e di conseguenza inibendo l'inizio della sintesi dell'RNA. Sono particolarmente attivi contro i micobatteri, come il *Mycobacterium tuberculosis* o il *Mycobacterium avium*.

Metronidazolo

È un farmaco utilizzato anche per trattare protozoi come il *Trichomonas vaginalis* ed ha attività antimicrobica poiché è il substrato di enzimi che riducono il suo nitrogruppo, determinando la produzione di composti citotossici dannosi per il DNA.

Antimetaboliti

I sulfamidici e il trimetoprim agiscono impedendo la sintesi dell'acido folico, indispensabile per i processi riproduttivi di molti microrganismi. Sono detti anche “antifolati” e sono spesso usati in associazione, perché agiscono in due punti diversi della stessa via.

1.2.4 Spettro antibatterico

Per quanto riguarda la classificazione degli antibiotici, risulta inoltre importante approfondire un altro concetto, quello di spettro antibatterico. Con spettro antibatterico si intende l'intervallo di attività di un antimicrobico contro i batteri. Gli antibiotici ad ampio spettro inibiscono sia i batteri Gram-positivi (ovvero i batteri che risultano positivi alla colorazione di Gram, rimanendo colorati di blu o viola) sia i batteri Gram-negativi (colorati di rosa con la colorazione di Gram). Gli antibiotici a spettro ristretto invece sono attivi solo contro un numero limitato di specie batteriche (Murray *et al.*, 2021). Ad esempio, lo spettro d'azione dei beta-lattamici è più o meno ampio a seconda del tipo di antibiotico considerato: esistono cefalosporine a spettro ristretto (ad esempio, la cefazolina) o ad ampio spettro (ceftriaxone), e lo stesso vale per le penicilline. I carbapenemi sono ad ampio spettro mentre i monobattamici sono a spettro più ristretto (sono attivi solo contro alcuni batteri aerobi Gram-negativi).

Gli antibiotici ad ampio spettro sono utili quando il patogeno non è noto, proprio per la loro azione contro un gran numero di specie batteriche, ma possono favorire l'insorgenza di resistenze e effetti collaterali. Queste conseguenze indesiderate sono determinate proprio dal fatto che colpiscono una vasta gamma di specie batteriche, tra cui anche quelle non direttamente implicate nella patologia infettiva che si sta cercando di trattare e quelle del microbiota intestinale, alterandolo. Creano quindi una pressione selettiva che agisce sull'insieme di batteri presenti nell'organismo, favorendo quelli più resistenti, anche se non solo quelli che si vuole effettivamente combattere. Come verrà trattato in seguito (Capitolo 6), l'approccio più adeguato al trattamento di un'infezione batterica, qualora il patogeno non sia noto e non si possa somministrare fin da subito una terapia mirata, consiste nell'attuare inizialmente una terapia empirica ragionata, ovvero imposta considerando i probabili agenti patogeni coinvolti e le loro suscettibilità, per poi

passare a una terapia mirata una volta conosciuti i risultati dell'antibiogramma (Cai, 2018).

1.3 Storia degli antibiotici

È comune pensare che i primi usi degli antibiotici si siano verificati in seguito alla scoperta della penicillina da parte di Alexander Fleming, nel 1928, ma in realtà l'esposizione dell'uomo a questi composti era già in atto da molto tempo. Un articolo pubblicato da Karen Hardy e dai suoi collaboratori (Hardy *et al.*, 2012) propone delle evidenze riguardo l'uso di piante medicinali da parte delle popolazioni Neanderthal. Tramite lo studio del tartaro rinvenuto nei resti di alcuni individui Neanderthal ritrovati in un sito in Spagna i ricercatori hanno determinato la presenza di pigmenti dal gusto amaro, come il diidroazulene, il camazulene e la cumarina, provenienti da piante senza valore nutrizionale. Si ipotizza quindi che il consumo di queste piante fosse per automedicazione, e non per ottenere nutrimento. Nel corso di un altro studio (Weyrich *et al.*, 2017) nel tartaro di un adolescente Neanderthal sono state rinvenute tracce di funghi e piante con specifiche proprietà terapeutiche: il pioppo, la cui corteccia contiene l'acido acetilsalicilico, principio attivo dell'aspirina (farmaco analgesico e antipiretico), e il fungo *Penicillium* da cui si ricava l'antibiotico penicillina. Ad ulteriore prova dell'uso terapeutico di questi elementi nel tartaro dello stesso soggetto sono state riscontrate tracce anche del patogeno *Enterocytozoon bieneusi*, che causa diarrea, oltre che evidenze di un ascesso. Si può quindi supporre che l'ingestione di questi prodotti vegetali, privi di particolari proprietà nutritive, fosse principalmente a scopo terapeutico.

È difficile dal punto di vista tecnico rilevare l'evidenza di esposizione agli antibiotici nelle popolazioni antiche, ma ciò risulta essere più facile se si ricercano nei reperti scheletrici tracce delle tetracicline, che essendo chelanti del calcio sono capaci di legarsi alla porzione minerale di idrossiapatite delle ossa e dello smalto dei denti. Sono state riscontrate tracce di questo tipo di antibiotici nei resti scheletrici provenienti da un sito archeologico in Sudan, risalenti ad un periodo compreso tra il 350 e il 550 d.C. (Bassett *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 2010). Le tetracicline sono prodotte da batteri del genere *Streptomyces*, che in determinate circostanze possono crescere nei contenitori utilizzati per l'immagazzinamento dei cereali. Il pattern di fissazione della tetraciclina nei resti ossei analizzati nello studio suggerisce un'esposizione cronica a questi antibiotici, determinata dalla loro assunzione attraverso la dieta. Non ci sono evidenze e non si suppone che queste sostanze fossero deliberatamente assunte a scopo terapeutico, ma sicuramente l'esposizione ad esse ebbe un effetto protettivo nei confronti di alcuni tipi di infezione:

uno studio avente come oggetto un'altra popolazione, in Egitto, ha messo in luce come i resti ossei contenenti tracce di tetraciclina non abbiano segni di osteomielite o altre infezioni (Cook *et al.*, 1989). Ci sono altre evidenze di un uso “tradizionale” di sostanze con proprietà antibiotiche nell'antichità, come gli aneddoti relativi alle cosiddette “terre rosse di Giordania”, utilizzate per trattare alcune infezioni della pelle. Nel corso di uno studio (Falkinham III *et al.*, 2009) è stato possibile individuare la presenza di microrganismi produttori di sostanze antimicrobiche nei campioni di terreno provenienti da diverse aree della Giordania, contribuendo così ad avvalorare l'ipotesi che già le popolazioni antiche avessero una conoscenza, seppure poco approfondita, di alcuni dei composti antibiotici e delle loro possibilità d'uso.

Anche nella medicina tradizionale cinese si utilizzavano erbe con proprietà antimicrobiche, sia contro batteri del cavo orale (Wong *et al.*, 2010), che contro il plasmodio della malaria. Infatti l'uso della artemisina, di origine vegetale, come principio attivo naturale contro la malaria ha le sue origini nella medicina tradizionale cinese (Cui *et al.*, 2009) e per le scoperte riguardo al suo uso è stato conferito il premio Nobel per la medicina alla scienziata cinese Youyou Tu nel 2015.

Dal punto di vista storico solo a partire dalla fine dell'800, grazie agli studi di Pasteur e Lister, si iniziarono a compiere dei rilevanti passi avanti riguardo alla conoscenza delle molecole con proprietà antibiotiche. Nel 1877 Luis Pasteur dimostrò che si poteva utilizzare un microrganismo per ucciderne un altro (Le Couteur *et al.*, 2006) e successivamente John Lister, noto per gli studi e le scoperte sugli antisettici, iniziò ad indagare riguardo le proprietà delle muffe. In realtà, il medico italiano Vincenzo Tiberio (1869-1915) già nel 1895 aveva pubblicato sugli *Annali d'Igiene sperimentale* un articolo intitolato “Sugli estratti di alcune muffe”. Egli notò come, quando si rimuoveva la muffa da un pozzo usato per ricavare acqua potabile, chi beveva l'acqua si ammalava di infezioni intestinali, cosa che invece non succedeva quando la muffa era presente (Tamburello *et al.*, 2017). Come determinato dallo stesso Tiberio, le tre specie di muffe prelevate nel pozzo erano *Aspergillus flavescens*, *Penicillium glaucum* e *Mucor mucedo*. Egli proseguì con le sue indagini scientifiche, raccogliendo campioni delle muffe, coltivandole e sperimentandone le azioni su diversi ceppi batterici. Egli osservò che, nella sostanza cellulare delle muffe esaminate, erano contenuti alcuni principi solubili in acqua, capaci di azione battericida e chemotattica. Dopo la sperimentazione *in vitro*, Tiberio dimostrò l'efficacia dei principi anche *in vivo*, su cavie e conigli. Formò per ciascuna specie due gruppi di animali: un gruppo veniva infettato mediante iniezione in peritoneo di specie batteriche patogene e poi trattato mediante inoculazione dell'estratto acquoso delle muffe, mentre il secondo gruppo veniva infettato ma non trattato. Gli animali trattati sopravvivevano, mentre

gli altri morivano in breve tempo, a dimostrazione dell'azione terapeutica dei composti. Purtroppo dopo la pubblicazione Tiberio si dedicò alla carriera di medico della Marina Militare e non portò avanti i suoi studi, che non furono notati dalla comunità scientifica internazionale.

La scoperta della penicillina, sostanza derivata da una muffa della famiglia *Penicillium*, è infatti attribuita al medico scozzese Alexander Fleming nel 1928. Fleming pubblicò i risultati sorprendenti dei suoi studi sulle colture e sui topi, riportando come la sostanza da lui chiamata penicillina fosse attiva contro molte specie di batteri anche a concentrazioni molto basse, ma questi risultati suscitavano poco interesse, anche perché esistevano già delle sostanze di sintesi attive contro i batteri, ovvero i sulfamidici. Questi corrispondono a un gruppo di sostanze, a cui appartengono ad esempio la sulfasalazina e il sulfametossazolo, scoperti nel 1935 dal medico tedesco Gerhard Domagk. Egli notò per primo le capacità antibatteriche del colorante Prontosil rosso, che nel corpo umano si scompone producendo sulfanilammide, ovvero la sostanza con effetto antibiotico (Domagk, 1935). Lo studio dei coloranti era in realtà iniziato alcuni decenni prima grazie a Paul Ehrlich, medico tedesco a cui nel 1908 è stato attribuito il premio Nobel per la medicina. Egli sintetizzò un composto detto “composto 606”, messo in commercio col nome di Salvarsan e attivo contro la sifilide. Quindi già prima di Fleming si utilizzavano sostanze con proprietà antibiotiche, infatti tra il 1935 e il 1946 furono prodotte più di 5000 variazioni della molecola della sulfanilammide, scoperta da Domagk, con grandissimo impatto sulla mortalità delle malattie infettive batteriche. Dopo l'introduzione dei sulfamidici il numero dei decessi da polmonite nei soli Stati Uniti diminuì di venticinquemila unità all'anno (Le Couteur *et al.*, 2006). Nonostante questi grandi successi, i sulfamidici erano e sono tutt'ora sostanze con importanti effetti collaterali, e per questo negli anni '30 del Novecento furono portate avanti le ricerche su come produrre e isolare la penicillina, approfondendo gli studi di Fleming. Nel 1941 fu compiuto con successo il primo esperimento clinico con penicillina grezza (quindi non più con il brodo di penicillina usato da Fleming, che era molto diluito) e da quel momento si iniziò a usare la penicillina come antibiotico, producendola prima dalle muffe, come estratto, e poi in laboratorio a partire dal 1957.

Il periodo tra gli anni '40 e gli anni '60 del Novecento è considerato “l'età d'oro degli antibiotici”, durante il quale sono state scoperte numerose nuove classi di composti. La grandissima maggioranza delle molecole ancora oggi in commercio è stata scoperta più di mezzo secolo fa e i nuovi antibiotici disponibili sono sempre meno. Tra i più rilevanti, il clovibactin, scoperto nel 2023 dallo studio dei batteri del suolo (Shukla *et al.*, 2023), che con un meccanismo di attacco multi-target blocca simultaneamente la sintesi della parete

cellulare batterica in posizioni diverse, e la lariocidina, antibiotico ad ampio spettro che ha come target il ribosoma (Wright *et al.*, 2024). È comunque evidente come, di fronte all'avanzare del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, lo sviluppo di nuovi antibiotici sia carente. In Italia gli antibiotici vengono somministrati al 44.7% dei degenti, contro una media europea del 33.7%, e nel 2023 quasi 4 persone su 10 hanno ricevuto almeno una prescrizione di antibiotico, con livelli più elevati al Sud, dove il 44.8% della popolazione ne ha assunto almeno uno in corso d'anno, contro il 30.9% del Nord e il 39.9% del Centro (Aifa, 2024). Inoltre, in termini di dosi standard (DDD-dosi definite die, che rappresentano per ciascuna sostanza la dose necessaria a coprire una giornata di terapia nell'adulto), l'utilizzo nel 2023 in Italia è stato pari a 21.2 DDD per 1000 abitanti die. I dati AIFA, in Tabella 1.1, rivelano un ampio uso comunitario di antibiotici nel periodo 2019 – 2023 a livello europeo, con Grecia, Romania e Bulgaria tra le nazioni con un uso più massiccio nel 2023. L'Italia si colloca in settima posizione. A questo uso di antibiotici relativo alla medicina generale bisogna poi aggiungere la quota consumata in ospedale; in Italia si stima un consumo pari 1,9 DDD per 1000 abitanti die, nel 2023. Anche per quanto riguarda questo parametro l'Italia è sopra la media europea di 1,6 DDD al giorno per 1000 abitanti e si colloca in quinta posizione, a pari merito con la Danimarca.

L'uso degli antibiotici, massivo al giorno d'oggi, ha avuto un grande impatto sulla mortalità per cause infettive e sulla mortalità globale, infatti già coi sulfamidici si è vista una riduzione del 25 – 40% nella mortalità materna, del 17 – 36% nella mortalità per polmonite e del 52 – 67% nella mortalità per scarlattina tra il 1937 e il 1943 (Jayachandran, 2010), e risultati ugualmente sorprendenti sono stati ottenuti grazie alla penicillina (Alsan, 2021) e ai successivi antibiotici scoperti. I tassi di mortalità per malattie infettive erano già in diminuzione grazie al miglioramento dell'igiene e delle condizioni di vita, ma gli antibiotici hanno svolto un ruolo determinante nel determinarne una riduzione. Sono quindi strumenti molto importanti, fondamentali in medicina, ma devono essere usati in modo ragionato al fine di preservarne al massimo le capacità antibatteriche.

Tabella 1.1: Consumo comunitario di antibatterici per uso sistemico, Paesi UE e SEE, 2019-2023 (espresso come DDD per 1.000 abitanti al giorno). Aifa, 2024.

Nazione	2019	2020	2021	2022	2023	Trend
Austria	9.8	7.1	7.2	8.8	9.5	
Belgio	19.8	15.3	16.0	19.0	19.1	
Bulgaria	19.1	20.7	22.4	24.2	24.6	
Cipro	–	–	–	–	–	–
Croazia	16.9	14.0	16.2	18.2	19.1	
Danimarca	13.4	12.5	12.6	13.3	14.3	
Estonia	10.2	8.8	8.7	10.8	11.2	
Finlandia	12.6	10.0	9.4	10.5	11.1	
Francia	23.3	18.7	19.9	22.6	22.3	
Germania	11.4	8.9	8.1	10.0	11.7	
Grecia	32.4	26.4	21.8	31.2	26.7	
Irlanda	21.0	17.1	16.3	21.5	20.7	
Islanda	18.0	15.4	15.7	17.5	17.4	
Italia	19.8	16.5	16.0	20.0	21.2	
Lettonia	12.0	10.0	10.2	13.4	13.3	
Lituania	14.0	11.9	12.1	16.2	16.3	
Lussemburgo	19.8	14.8	14.6	17.6	18.7	
Malta	18.7	14.4	14.1	21.7	20.9	
Norvegia	13.6	12.8	12.8	14.0	14.2	
Paesi Bassi	8.7	7.8	7.6	8.3	8.3	
Polonia	22.2	17.1	18.8	22.3	21.8	
Portogallo	17.9	13.7	13.7	17.1	18.0	
Repubblica Ceca	–	–	11.5	13.9	15.0	–
Romania	24.0	23.7	24.3	26.2	25.8	
Slovacchia	18.0	13.2	14.5	19.7	19.0	
Slovenia	11.5	8.8	8.7	11.0	11.9	
Spagna	23.3	18.2	18.5	21.7	22.5	
Svezia	10.3	8.9	8.7	9.6	–	–
Ungheria	13.0	10.0	10.4	13.4	13.1	
EU/EEA	18.3	15.0	15.1	17.9	18.3	

Capitolo 2

L'antibiotico-resistenza

2.1 Definizione e epidemiologia

Con il termine antibiotico-resistenza (ABR) si intende la capacità di un batterio di non risentire dell'azione di un farmaco antibiotico (Aifa, 2018). L'antibiotico-resistenza è oggi una delle più gravi minacce per la salute pubblica a livello globale: in Europa si verificano ogni anno più di 670 000 infezioni da batteri antibiotico-resistenti e muoiono circa 35 000 persone a causa di queste infezioni (ECDC, 2022). Quasi un terzo delle morti si verificano in Italia e si stima che nel 2050 l'antibiotico-resistenza diverrà in questa nazione la prima causa di morte, superando anche i tumori. Queste infezioni e le misure per contrastarle sono responsabili di un significativo assorbimento di risorse, sanitarie e non, che in Italia ammontano a circa 1,5 miliardi di euro l'anno.

Sempre dal report dell'ECDC si evince che in Europa tra il 2016 e il 2020 c'è stato un significativo aumento sia nel numero di infezioni sia nel numero di morti dovute a queste infezioni, anche se si è registrata una lieve deflessione dal 2019 al 2020. Un ulteriore parametro per misurare l'impatto di queste infezioni, oltre a numero di casi e numero di morti, sono i DALYs, Disability-adjusted life years, ovvero gli anni di vita corretti per la disabilità. Si calcolano sommando gli anni di vita persi e gli anni vissuti con disabilità a causa della malattia e sono una misura importante per quantificare l'impatto di numerose patologie, comprese le infezioni da patogeni resistenti. Queste in Europa sono responsabili di un numero di DALYs che va da 909 488 DALYs nel 2016 a 1 101 288 nel 2019, con una lieve diminuzione nel 2020 (1 014 799 DALYs). Come si vede dalla Figura 2.1, in Europa l'Italia risulta essere tra i Paesi con il maggiore numero di DALYs per 100 000 abitanti, insieme a Portogallo, Romania, Polonia, Grecia e Cipro.

Dal punto di vista mondiale, si è stimato che nel 2019 ci sono state quasi 5 milioni

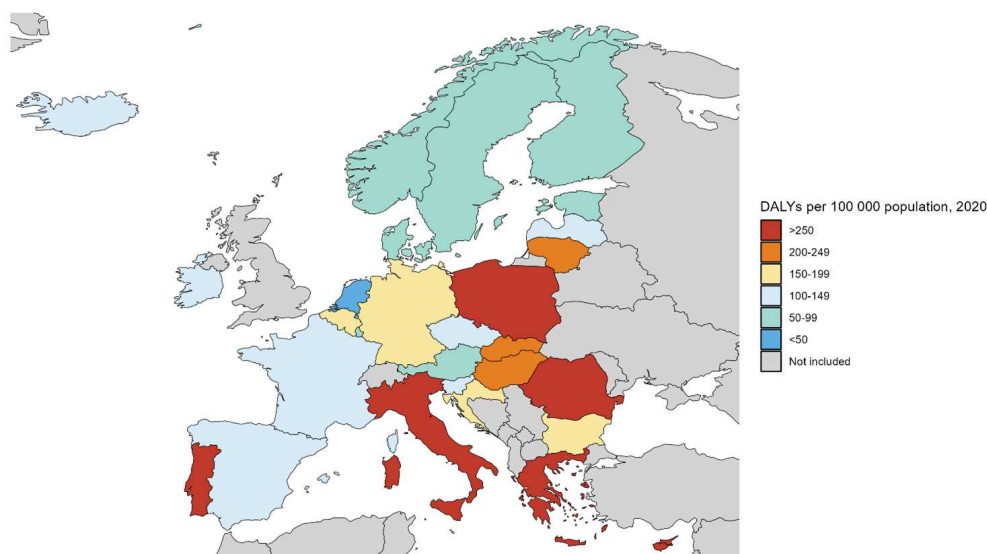


Figura 2.1: DALYs per 100 000 abitanti nel 2020, adattata da ECDC (2022).

di morti associate all'antibiotico-resistenza. Considerando le singole regioni, si stima che il più alto numero di decessi *attribuibili* all'ABR si verifica nell'Africa subsahariana, con circa 27 morti per 100 000 abitanti (Murray *et al.*, 2022). Superiore è poi il numero di morti *associate*, ma non attribuibili in modo univoco, all'ABR. Come si vede dalla Figura 2.2, così come accade per le morti attribuibili all'ABR, anche il più alto numero di morti associate all'ABR si verifica in Africa. Le morti associate all'antibiotico-resistenza sono le morti in cui la presenza di una infezione resistente ha avuto un peso nella determinazione del decesso insieme ad altri fattori, come può essere ad esempio un caso di sepsi verificatasi in un individuo con una o più ulteriori patologie significative compresenti. Queste morti sono rappresentate nel grafico tramite barre di colore più tenue. Se si considerano le morti attribuibili all'antibiotico-resistenza, ovvero le morti in cui l'infezione da patogeni resistenti è stata la causa primaria del decesso, rappresentate nel grafico da barre in colore più scuro, si nota che i tassi di morte per 100 000 abitanti sono inferiori e più simili tra le diverse zone del mondo, seppure con valori maggiori sempre nell'Africa subsahariana.

Le ragioni per cui l'Africa subsahariana registra più elevati livelli di antibiotico-resistenza sono complesse e molteplici, tra cui l'improprio utilizzo di agenti antimicrobici, l'uso di medicinali inadeguati o contraffatti e i bassi livelli di aderenza ai trattamenti. Inoltre, l'individuazione della resistenza e il suo monitoraggio richiedono laboratori adeguati e sistemi di sorveglianza, infrastrutture e conoscenze che devono essere mi-

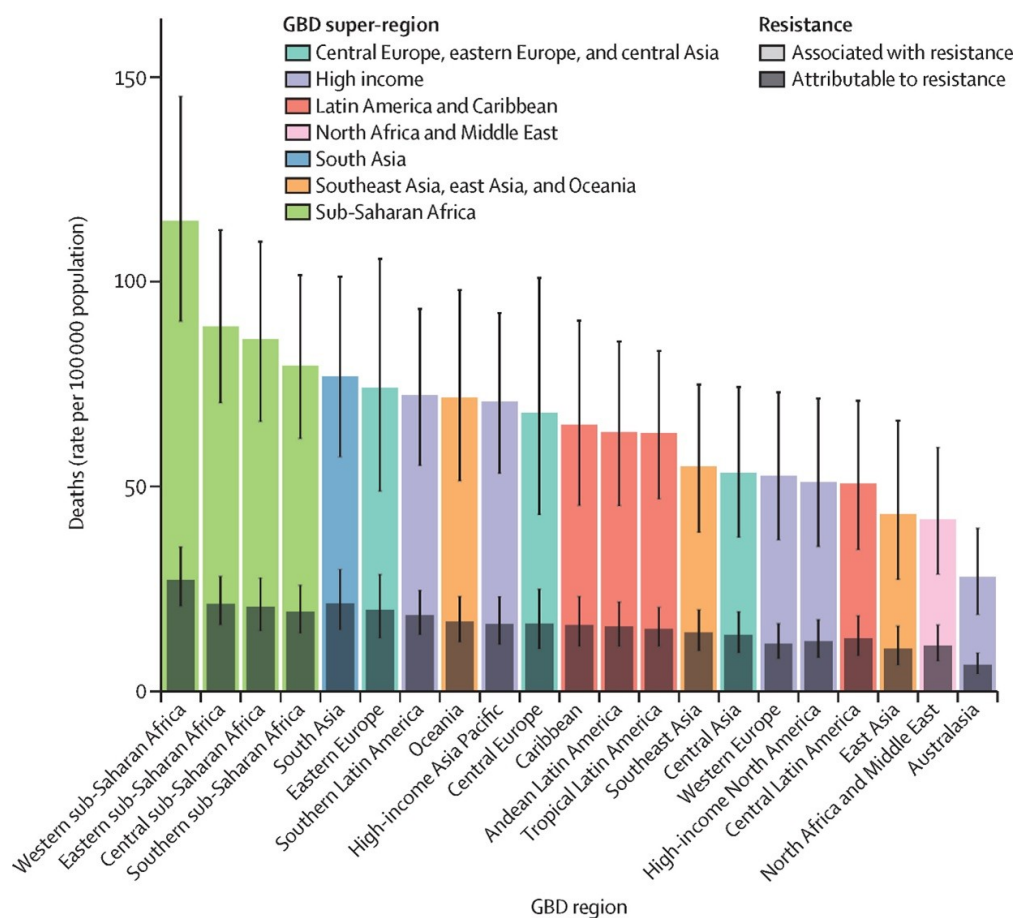


Figura 2.2: Morti associate e attribuibili all'ABR, per 100 000 abitanti, tratta da Murray *et al.*, (2022).

gliorate cosicch  questa regione sia grado di affrontare in modo adeguato il problema (Nabyonga-Orem, 2014, p.27)

Dal punto di vista del tipo di infezione, il maggior numero di morti associate all'ABR, pari a 1.5 milioni nel 2019,   dovuto a patologie respiratorie. Le altre due cause per numerosit  di casi sono le infezioni del sangue e le infezioni intra-addominali. Nel complesso, queste tre situazioni sono responsabili del 78% di tutte le morti attribuibili all'antibiotico-resistenza (Murray *et al.*, 2022).

2.2 Specie batteriche resistenti

In Italia, le specie batteriche sottoposte a sorveglianza da parte dell'ISS (Istituto Superiore di Sanit ) sono otto: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus*

faecalis, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter species*.

Questi patogeni, che possiedono diversi e molteplici meccanismi di resistenza (trattati nel capitolo 3), sono quelli attualmente più rilevanti dal punto di vista della salute pubblica e pertanto sono quelli a cui è rivolta maggiore attenzione in Italia e nel mondo. Le principali combinazioni patogeno/antibiotico particolarmente rilevanti e quindi sotto osservazione sono:

- *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA);
- *Enterococcus faecium* resistente alla vancomicina (VRE);
- *Escherichia coli* resistente alle cefalosporine di terza generazione (CREC);
- *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CRKP);
- *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai carbapenemi (CRPA);
- *Acinetobacter spp* resistenti ai carbapenemi (CRAS);

Dal rapporto dell'ISS sull'antibiotico resistenza del 2024, basato su dati fino al 2023 (ISS, 2024), si nota come in Italia nel 2023 le percentuali di resistenza alle principali classi di antibiotici per gli otto patogeni sotto sorveglianza continuino a mantenersi elevate, tuttavia per alcune combinazioni patogeno/antibiotico, in particolare per *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), si osserva un andamento in diminuzione rispetto agli anni precedenti.

Tra le specie batteriche Gram-positive, per *Staphylococcus aureus* la percentuale di isolati resistenti alla meticillina (MRSA) è diminuita ad un valore pari al 26.6% registrando una ulteriore flessione rispetto al biennio 2021-2022, in cui il valore della percentuale di isolati resistenti era rimasto stabile al 30%. Anche per *Acinetobacter spp.* la percentuale di isolati resistenti alle principali classi di antibiotici è notevolmente diminuita pur rimanendo a livelli alti. Per *Enterococcus faecium* resistente alla vancomicina l'andamento invece è in preoccupante aumento: si continua infatti ad osservare un incremento nella percentuale di isolati resistenti alla vancomicina, percentuale che è passata dall'11.1% del 2015 al 32.5% nel 2023. Per *Streptococcus pneumoniae*, dopo un aumento registrato nel 2022, la percentuale di isolati resistenti alla penicillina nel 2023 si mantiene sostanzialmente stabile. Diversamente, per la resistenza alla eritromicina si osserva un lieve incremento.

Tra le specie batteriche Gram-negative, la percentuale di resistenza alle cefalosporine di terza generazione in *Escherichia coli* è lievemente aumentata nel 2023 rispetto al 2022

e inoltre, dopo un andamento in diminuzione nel periodo 2015-2022, si osserva nel 2023 un lieve aumento della percentuale di resistenza agli aminoglicosidi e ai fluorochinoloni. Nel 2023 si registra di nuovo un lieve aumento della percentuale di isolati di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi. La resistenza ai carbapenemi si continua a mantenere molto bassa in *E. coli* (0.4%), sostanzialmente stabile in *Pseudomonas aeruginosa* e in evidente diminuzione in *Acinetobacter* spp. (da 88.5% nel 2022 a 75.8% nel 2023).

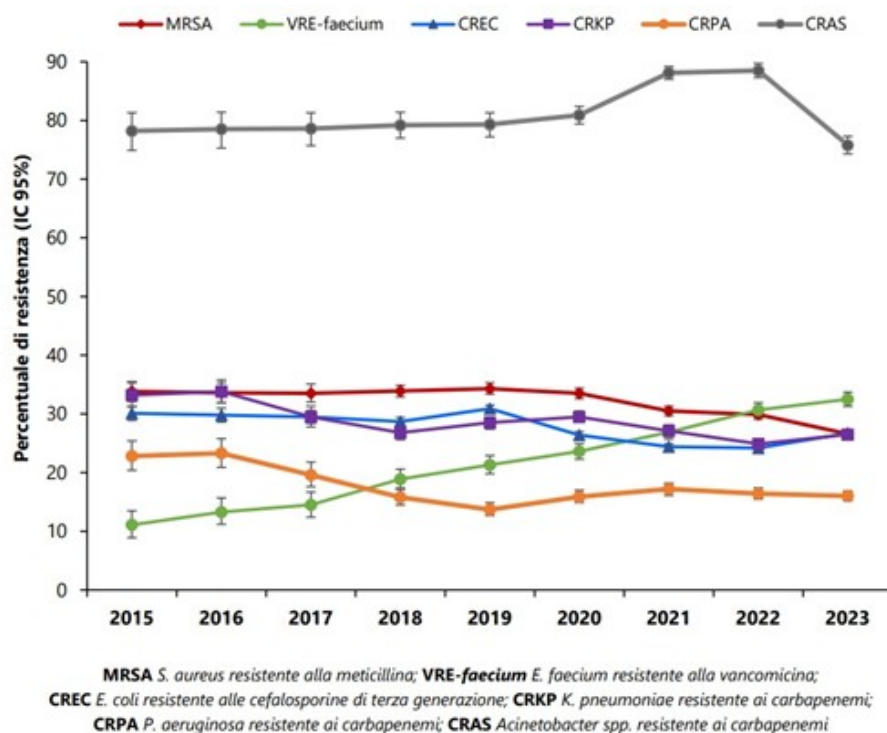


Figura 2.3: Percentuale di resistenza delle principali combinazioni patogeno/antibiotico. Italia, 2015-2023, tratta dal report ISS (2024).

In modo analogo alla situazione italiana, dal rapporto dell'ECDC del 2022 si nota come anche in Europa nel periodo 2016 – 2020 ci sia stato un aumento del numero di infezioni da batteri resistenti, pur essendoci casi di diminuzione del trend come nel caso del MRSA, che comunque rimane significativo dal punto di vista della rilevanza sanitaria come dimostrato dal numero di morti da esso provocate. L'impatto sanitario maggiore è causato dall'*Escherichia coli* resistente alle cefalosporine di terza generazione, seguito dal MRSA e dalla *Klebsiella pneumoniae* anch'essa resistente alle cefalosporine di terza generazione. Questi tre patogeni sono responsabili del 58% del peso sanitario misurato in DALYs (ECDC, 2022).

Anche dal punto di vista globale i patogeni responsabili del maggior numero di morti associate a resistenza sono gli stessi, infatti si stima che i batteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (ordinati per numero di morti provocate decrescente) siano stati responsabili di 929 000 morti attribuibili all'ABR to AMR e di 3.57 milioni di morti associate all'ABR nel 2019 nel mondo (Murray *et al.*, 2022).

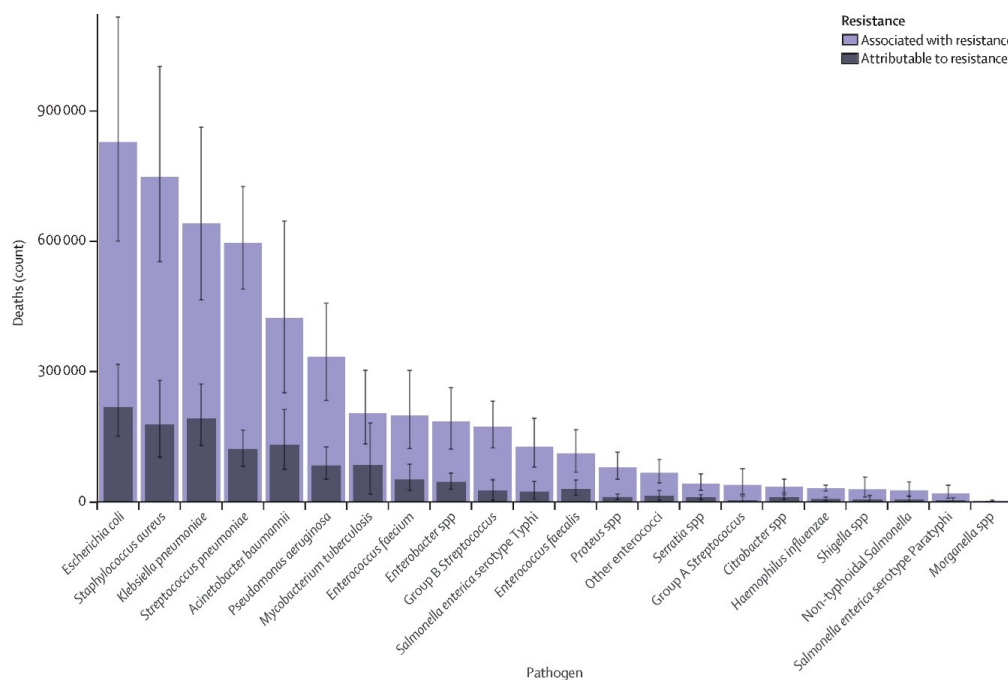


Figura 2.4: Numero di morti globali attribuibili e associate all'antibiotico-resistenza per patogeno, tratta da Murray *et al.*, (2022).

Il rapporto dell'OMS "Bacterial Priority Pathogens List", del 2024 (WHO, 2024) ha stilato una lista di batteri il cui trattamento costituisce una priorità per la salute pubblica, suddividendoli in "gruppo critico", "gruppo ad alto rischio" e "gruppo a medio rischio". I criteri utilizzati per la definizione dei gruppi sono la mortalità, l'incidenza di casi, i DALYs, il trend di resistenza, la trasmissibilità, la disponibilità di misure di prevenzione, la trattabilità (determinata dalla disponibilità di farmaci, dalla loro efficacia e profilo di sicurezza oltre che da altri parametri) e la "pipeline", ovvero la stimata disponibilità di nuove molecole agenti contro quel patogeno nel futuro. Il "gruppo critico" consiste in batteri resistenti che rappresentano la maggiore minaccia per la salute pubblica ed è costituito da *Enterobacterales* carbapenemi-resistenti, *Enterobacterales* resistenti a cefalosporine di terza generazione, *Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi e *Mycobacterium*

tuberculosis rifampicina-resistente, incluso nella lista a seguito di una analisi indipendente con criteri sovrapponibili a quelli dell'analisi principale. Il gruppo "ad alto rischio" comprende i patogeni *Salmonella Typhi* resistente ai fluorochinoloni, *Shigella* spp. resistenti ai fluorochinoloni, *Enterococcus faecium* resistente alla vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai carbapenemi, *Salmonella* non tifoide resistente ai fluorochinoloni, *Neisseria gonorrhoeae* resistente alle cefalosporine di terza generazione e/o ai fluorochinoloni e *Staphylococcus aureus* meticillino resistente. Il gruppo "a medio rischio" è costituito dai patogeni Streptococchi di gruppo A resistenti ai macrolidi, *Streptococcus pneumoniae* resistente ai macrolidi, *Haemophilus influenzae* ampicillino-resistente e Streptococchi di gruppo B penicillino - resistenti.

Confrontando diverse fonti e istituzioni si può notare quindi come, pur utilizzando criteri diversi e producendo risultati leggermente differenti, esse giungano sempre alla medesima conclusione: la rilevanza di questi patogeni e del problema dell'antibiotico-resistenza dal punto di vista della salute pubblica è significativa e le specie coinvolte sono varie e numerose.

2.3 Antibiotico-resistenza verso molteplici farmaci

Viene definita resistenza multipla agli antibiotici o multi-resistenza (*multidrug resistance*, MDR, in inglese) quella che interessa più antibiotici appartenenti a classi diverse (Aifa, 2018). I batteri possono essere anche ampiamente resistenti (*extensively resistant*, XDR) se sono non suscettibili ad un ampio spettro di antibiotici, pur mantenendo la sensibilità ad alcune molecole; se invece un batterio diventa resistente a tutti gli antibiotici disponibili in quel momento contro di esso viene detto pan-resistente (PDR). La multi-resistenza rappresenta una seria problematica dal punto di vista sanitario, in quanto la resistenza ad alcuni antibiotici impone l'uso di farmaci di seconda o terza linea, tipicamente più problematici dal punto di vista degli effetti collaterali o delle interazioni con altre molecole. Quando un'infezione non risponde a un trattamento antimicrobico di prima linea (ovvero l'opzione di trattamento più efficace e sicura per il paziente), si rende necessario utilizzare alternative di seconda e terza linea. Eventuali complicazioni o la durata prolungata di una malattia a causa della resistenza iniziale possono richiedere ricoveri più lunghi, che a loro volta comportano costi maggiori, con ricadute sia sul paziente sia sulla struttura sanitaria. I più tipici meccanismi di generazione della resistenza multipla nei batteri sono due: l'accumulo di molteplici geni, ciascuno codificante per la resistenza a un farmaco specifico, in una singola cellula, oppure l'aumentata espressione di geni che

codificano per pompe di efflusso che permettono l'estrusione dalla cellula di vari farmaci (Nikaïdo, 2009). Questi meccanismi verranno approfonditi in dettaglio nel Capitolo 3.

Dal punto di vista epidemiologico la multi-resistenza non è una evenienza infrequente, infatti dal report ISS del 2024 si nota come nei campioni italiani il 28.1% degli isolati di *K. pneumoniae* e il 9.1% degli isolati di *E. coli* siano risultati multi-resistenti (resistenti a cefalosporine di terza generazione, aminoglicosidi e fluorochinoloni); questi valori rispetto a quelli del 2022 sono in lieve aumento per *E. coli* e in lieve diminuzione per *K. pneumoniae* ma complessivamente in diminuzione per entrambe le specie se si considera il periodo 2015-2023. Per *P. aeruginosa* la percentuale di resistenza a tre o più antibiotici è risultata in lieve diminuzione rispetto agli anni precedenti e pari a 10,1%. Inoltre, si osserva una evidente diminuzione nella percentuale di multi-resistenza (fluorochinoloni, aminoglicosidi e carbapenemi), in *Acinetobacter* spp. (da 85.2% nel 2022 a 72.9% nel 2023) sebbene il valore rimanga comunque molto elevato.

La rilevanza del fenomeno della multi-resistenza è quindi notevole, dato che l'impossibilità di usare molteplici farmaci costringe i professionisti sanitari ad affidarsi a molecole con costi o effetti collaterali maggiori, aumentando sia la spesa sanitaria della struttura sia i rischi per il paziente.

2.4 Antimicrobico-resistenza

Trattando dell'antibiotico-resistenza non si può non menzionare l'antimicrobico-resistenza (AMR), concetto che comprende la resistenza, oltre che agli antibiotici, anche a farmaci antifungini, antiprotisti e antivirali. La resistenza antimicrobica è infatti la capacità dei microrganismi di sopravvivere o crescere nonostante un agente antimicrobico che di norma inibisce o uccide tale microrganismo. Un esempio è il caso della resistenza agli antivirali in corso di terapia per l'HIV, molto studiata data la rilevanza mondiale del problema. In uno studio del 2018 che ha analizzato la situazione in un'ottica globale (Zazzi *et al.*, (2018) si è visto che nel periodo 1996 - 2016 il trend di emergenza di resistenze è aumentato, con però delle differenze tra le diverse aree geografiche. In generale, la prevalenza di resistenze nel periodo citato è stata del 12% per i farmaci inibitori della proteasi (PI), del 21% per gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) e del 22% per gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI). Queste sono percentuali elevate che rappresentano una problematica sanitaria significativa, data la prevalenza dell'infezione e le conseguenze dell'eventuale inefficacia del trattamento.

Un ulteriore esempio di AMR è costituito dalla resistenza a farmaci antiparassitari come gli anti-elmintici, un problema tipicamente veterinario ma che può coinvolgere anche

l'uomo. L'antielmintico-resistenza è la capacità, trasmissibile alla prole del parassita, di sopravvivere a una dose normalmente efficace del farmaco. È un tratto genetico: il parassita può essere omozigote resistente o eterozigote resistente. Gli eterozigoti sono ancora sensibili alla dose corretta dell'antielmintico ma possono sopravvivere se è sotto dosato, mentre gli omozigoti sono resistenti ma possono essere sensibili ad alti dosaggi o all'uso combinato di antielmintici. L'omozigosi è rara in popolazioni non selezionate ma una volta che la selezione è avvenuta la resistenza è mantenuta. Inoltre, se un parassita è resistente ad un antielmintico sarà resistente a tutte le molecole di quella classe di farmaci e questo costituisce un problema per il trattamento di queste infezioni (IZSLT, 2020). Si deduce quindi come la resistenza ai farmaci antimicrobici - antibiotici, antivirali, antifungini o antiparassitari che siano - rappresenti un problema trasversale che interessa più discipline e lo studio del fenomeno, così come lo sviluppo di protocolli finalizzati a contrastarlo, sono azioni necessarie che possono produrre conoscenze sia teoriche che pratiche sfruttabili in più ambiti.

2.5 Il legame tra l'antibiotico-resistenza e l'assistenza sanitaria

Nel rapporto dell' European Centre for Disease Prevention and Control si riporta che il 70.9% delle infezioni con batteri antibiotico-resistenti sono infezioni associate all'assistenza sanitaria, così come il 71.4% delle morti e il 73.0% dei DALYs (ECDC, 2022). I dati italiani (ISS, 2024) mostrano che, dal punto di vista dell'area di ricovero, il maggior numero di isolati proviene dai reparti di medicina (47.0%), seguita dal pronto soccorso (21.9%) e dalla terapia intensiva (13.4%). Altri studi, anche a livello locale, hanno confermato la maggiore prevalenza delle resistenze agli antibiotici in ambito ospedaliero rispetto al contesto extra-ospedaliero (Matta *et al.*, 2018). Questa differenza di prevalenza è dovuta a numerosi fattori, sia relativi alle caratteristiche del paziente-tipo ricoverato in ospedale sia relativi all'ambiente ospedaliero stesso. Nell'ambito delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria hanno infatti un significativo peso la maggiore età, i più alti tassi di immunosoppressione e di comorbidità dei pazienti e il maggiore uso di antibiotici nel contesto ospedaliero, cosa che aumenta la pressione selettiva sui batteri presenti e favorisce l'emergenza di resistenze. Inoltre negli ospedali e nelle case di cura sono posti in stretta vicinanza individui colonizzati da patogeni differenti. Tutti questi fattori favoriscono lo sviluppo di resistenze e questo, unito alla fragilità dei pazienti ricoverati, incide sulla rilevanza del fenomeno in termini di numero di morti e carico di malattia. Per questi

motivi è sicuramente opportuno che le strategie per affrontare il problema siano incentrate sulla diminuzione del rischio di insorgenza di resistenze nel contesto ospedaliero, ma non va dimenticata l'interconnessione tra mondo sanitario, comunità extra-ospedaliera e ambiente, come suggerito dall'approccio *One Health* (concetto trattato nel Capitolo 6).

Capitolo 3

I meccanismi dell'antibiotico-resistenza

3.1 Visione generale dei diversi meccanismi di resistenza

Capire i meccanismi molecolari che i batteri usano per resistere all'azione degli antibiotici risulta essere cruciale per lo studio della resistenza, per il miglioramento dell'uso degli antibiotici e per ideare nuovi farmaci meno suscettibili alle resistenze, così come per pianificare strategie per contrastare questo fenomeno (Darby *et al.*, 2023). I meccanismi di resistenza sono molteplici e vari: i principali sono la diminuzione della permeabilità al farmaco, la presenza di pompe di efflusso, la modifica del target del farmaco, l'inattivazione o modifica del farmaco e il bypass del target.

3.2 Riduzione della permeabilità al farmaco

La diminuzione della permeabilità al farmaco è dovuta a cambiamenti nella struttura della membrana batterica, come la downregolazione delle porine, proteine transmembrana che permettono il trasporto passivo di diversi composti, tra cui gli antibiotici, nella cellula (Fernandez *et al.*, 2012). Queste proteine permettono l'uptake di composti idrofilici fino a determinate dimensioni e sono state caratterizzate per la prima volta nel 1976 nel batterio *Escherichia coli* (Nakae, 1976). Le porine sono attualmente state identificate sia nei batteri Gram-negativi che nei micobatteri. I batteri Gram-negativi hanno una parete cellulare più complessa rispetto ai Gram-positivi, infatti questa è composta da due strati esterni alla membrana citoplasmatica (un sottile strato di peptidoglicano e la membrana esterna, peculiare di questo tipo di batteri). Proteine transmembrana come

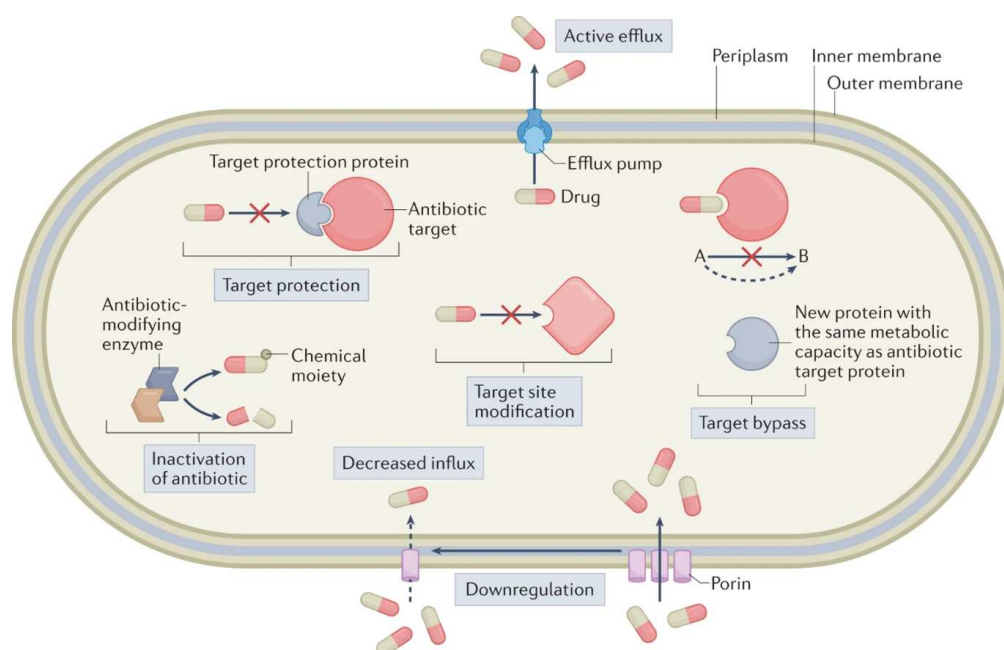


Figura 3.1: Panoramica dei meccanismi di antibiotico-resistenza, tratta da Darby, 2023.

le porine permettono la diffusione attraverso la membrana di molecole idrofile di massa inferiore a 700 Da (Murray *et al.*, 2021).

Nei batteri Gram-positivi, invece, l'assenza della membrana esterna determina già di per sé una maggiore sensibilità a svariati antibiotici, ma anche in questo tipo di batteri, caratterizzati dall'assenza delle porine, sono stati documentati meccanismi di riduzione della permeabilità ai farmaci. In particolare, cambiamenti nella composizione della membrana plasmatica, che influenzano la sua fluidità, sono responsabili di riduzione della permeabilità agli antibiotici. In uno studio (Mishra *et al.*, 2012) si è dimostrato che la resistenza alla daptomicina è associata ad alcune alterazioni della membrana fosfolipidica nel batterio Gram-positivo *Enterococcus faecium*. Le alterazioni sono dovute a mutazioni in geni che codificano per enzimi coinvolti nell'omeostasi della parete cellulare e nel metabolismo dei fosfolipidi. Questo è rilevante perché la daptomicina è uno dei pochi antibiotici che in vitro ha dimostrato attività battericida contro gli enterococchi, inclusi quelli vancomicina-resistenti e ampicillina-resistenti. Nello studio si è osservato che lo sviluppo di resistenza alla daptomicina è associato a cambiamenti strutturali e funzionali nella parete batterica, come il suo ispessimento e la riduzione nella fluidità. Questa relazione tra variazioni nelle proprietà di membrana e resistenza alla daptomicina è stata osservata anche per altre specie batteriche, come *Staphylococcus aureus* (Yang *et*

al., 2009).

3.3 Pompe di efflusso

L'efflusso attivo di molecole fuori dalla cellula batterica è facilitato da proteine dette pompe di efflusso, che permettono l'esportazione di antibiotici al di fuori della cellula riducendone così la concentrazione intracellulare. Tutti i genomi batterici includono geni che codificano per proteine di trasporto, ad esempio nel genoma di *E. coli* sono presenti 591 geni di questo tipo che rappresentano il 13% del genoma (Wright, 2007). Una sottoparte di queste proteine di trasporto sono appunto le pompe di efflusso. La maggior parte di queste proteine non è selettiva per una specifica classe di antibiotici, ma permette l'efflusso di svariati composti tossici: in questo caso, la resistenza all'antibiotico è innata nel batterio. Altri sistemi di efflusso, invece, sono altamente specifici e possono essere innescati dall'esposizione agli antibiotici. Un esempio è la proteina di efflusso TetA, associata alla membrana e selettiva per le tetracicline. L'espressione del gene *tetA* è regolata negativamente da TetR, un regolatore genico sensibile alle tetracicline che controlla strettamente l'espressione delle pompe di efflusso (Ramos *et al.*, 2005). Le proteine della famiglia TetR sono state trovate in 115 generi di Gram-positivi, nei proteobatteri, nei cianobatteri e negli archaea. Il gene *tetR* si trova adiacente, ma orientato in modo opposto, a *tetA* e il prodotto genico di *tetR* controlla l'espressione di entrambi i geni. La regione intragenica tra *tetR* e *tetA* contiene due operatori a cui si lega la proteina TetR, in forma di omodimero, impedendo la trascrizione a partire da entrambi i promotori. Quindi normalmente l'espressione di TetA, proteina di efflusso, è repressa. Quando una tetraciclina, complessata con Mg^{2+} , si lega al repressore TetR, si verifica un cambio conformazionale che rende TetR incapace di legarsi al DNA, di conseguenza è permessa l'espressione sia di TetR che di TetA. In presenza di tetracicline, quindi, è favorita l'espressione nella cellula batterica di proteine di efflusso (TetA) che ne determinano l'estruzione dalla cellula, riducendone la concentrazione intracellulare e conseguentemente la sensibilità del batterio all'antibiotico.

Questo non è l'unico caso in cui l'espressione delle pompe di efflusso è influenzata dai livelli di antibiotico. Una situazione analoga si verifica infatti con l'uso dell'etionamide, farmaco di seconda linea usato per il trattamento della tubercolosi in pazienti che hanno sviluppato resistenza per molecole di prima linea come l'isoniazide e la rifampicina. L'attivazione del profarmaco è regolata dalla monossigenasi EthA e dal repressore EthR, della famiglia dei repressori TetR. Le due sequenze geniche sono vicine nel genoma del *Mycobacterium tuberculosis*. È stato dimostrato (Ramos *et al.*, 2005) che EthR reprime

la trascrizione del gene *ethA* legandosi alla regione intergenica tra i due e di conseguenza contribuendo alla resistenza all'etionamide. Infatti se l'enzima EthA non è prodotto non si ha la conversione del profarmaco in farmaco e quindi la molecola non risulta farmacologicamente attiva. Una caratteristica strutturale interessante del repressore EthR è la presenza di una cavità che si presume possa servire come sito di legame per un ligando, il quale però rimane al momento sconosciuto.

Altre pompe di efflusso regolate in questo modo sono state identificate in batteri come *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae*, inseriti dall'OMS rispettivamente nei gruppi "critico" e "ad alto rischio" per quanto riguarda l'emergenza di resistenze: si capisce come lo studio di questi meccanismi rappresenti un punto di partenza di notevole rilevanza nel contesto della risposta a questo fenomeno.

3.3.1 Pompe di efflusso e resistenza multifarmaco

Come accennato precedentemente, le pompe di efflusso che permettono il trasporto di vari composti possono essere associate alla *multidrug resistance*. L'efflusso è sospettato essere il meccanismo alla base dell'antibiotico-resistenza qualora ci sia un simultaneo incremento della MIC di tre o più antibiotici in un particolare batterio. Ad esempio, se si ha un campione da un paziente e si riscontra che le MIC per tre o più antibiotici sono notevolmente aumentate rispetto a quelle degli isolati pre-terapia o rispetto ai livelli standard, si può sospettare l'estrusione dei farmaci dalla cellula tramite le pompe di efflusso (Piddock, 2006).

La prima pompa di efflusso multifarmaco identificata nei batteri appartiene alla famiglia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) ed è il trasportatore QuacA; essa è stata scoperta tramite l'analisi di ceppi di *S. aureus* resistenti a molteplici antibiotici battericidi (Paulsen *et al.*, 1996). Da quel momento sono state individuate molteplici famiglie di pompe di efflusso multifarmaco, ed è stato maggiormente chiarito il loro ruolo nella generazione della resistenza agli antibiotici.

Si ritiene che i trasportatori multifarmaco abbiano come funzione principale qualcosa di diverso rispetto alla esportazione di agenti ambientali dannosi per la cellula, ma in letteratura il dibattito a riguardo è ampio (Poole, 2005). Quello di cui si ha evidenza consiste nell'induzione di questi sistemi di efflusso da parte degli stessi agenti che vengono da essi esportati. Un esempio di trasportatore multifarmaco, che avvalora questa teoria, è rappresentato dal sistema MexXY-OprM del batterio *Pseudomonas aeruginosa*, che è indotto dalle stesse molecole che trasporta fuori dalla cellula, tra cui svariati antibiotici come gentamicina, eritromicina e tetracicline. Si può quindi pensare che questa sia la

sua funzione, ma è anche possibile che l'azione di questi agenti sui loro target ribosomiali (questi sono infatti antibiotici inibitori della sintesi proteica agenti sul ribosoma) induca l'espressione delle proteine costituenti il sistema di efflusso come risultato dell'accumulo di prodotti cellulari la cui esportazione è a carico del sistema di efflusso stesso. La conoscenza di questi sistemi è quindi ancora limitata, ma appare chiaro il loro ruolo nel contribuire all'antibiotico-resistenza.

3.4 Alterazione, modifica e protezione del target

L'alterazione del sito target dell'antibiotico è un meccanismo attraverso cui può realizzarsi l'antibiotico-resistenza e ha come conseguenza la ridotta capacità di legame dell'antibiotico al sito. Mutazioni in geni target, come per esempio *gyrA* e *parC* nel caso dei fluorochinoloni, o *rpoB* per la rifampicina, possono rendere non suscettibili i batteri a questi antibiotici (Wright, 2007). La resistenza ai fluorochinoloni è principalmente determinata dalle mutazioni negli enzimi target di questi antibiotici, le DNA topoisomerasi. I ceppi mutanti portatori di questa alterazione in presenza di una pressione selettiva diverranno sempre più prevalenti. La rifampicina normalmente si lega alla subunità β della RNA polimerasi DNA dipendente, codificata dal gene *rpoB*. Mutazioni in questo gene determinano un cambiamento conformazionale della proteina codificata e questo influenza l'affinità di legame della rifampicina. Si stima che il 90 – 95% degli isolati resistenti alla rifampicina siano portatori di mutazioni nel gene *rpoB* (Li *et al.*, 2021).

La modifica del target può realizzarsi anche tramite l'alterazione di questo mediante enzimi, cosa che accade per antibiotici come i glicopeptidi, le polimixine e la maggior parte degli antibiotici agenti sui ribosomi (Schaenzer *et al.*, 2020). La resistenza ai glicopeptidi è data dalla modifica del precursore del peptidoglicano, anche se i lipoglicopeptidi di seconda generazione non risentono di questo impedimento di azione. La modifica dei lipopolisaccaridi determina invece la resistenza alle polimixine, il cui meccanismo di azione consiste nell'interazione con i lipopolisaccaridi e i fosfolipidi della membrana esterna, cosa che causa un aumento nocivo della permeabilità cellulare. Un tipo di polimixina è la colistina, considerata il trattamento di ultima linea contro infezioni da Gram-negativi multiresistenti. Per questo, l'emergenza dei geni per la resistenza alla colistina, portati da vari plasmidi, ha suscitato grande preoccupazione nel mondo sanitario. Il gene *mcr-1* codifica per una proteina legata alla membrana, MCR-1, il cui dominio catalitico è cMCR. Questa proteina MCR-1 è una fosfoetanolammina transferasi che aggiunge fosfoetanolammina ai lipopolisaccaridi, riducendo l'affinità per la colistina. Infatti la fosfoetanolammina determina un aumento della carica positiva del lipide A, componente

essenziale dei lipopolisaccaridi (LPS) che si trovano nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi. Il lipide A così modificato può stabilire dei legami idrogeno con i gruppi fosfato delle unità vicine di lipide A, rendendo la membrana più resistente alla azione della colistina (Liu *et al.*, 2024).

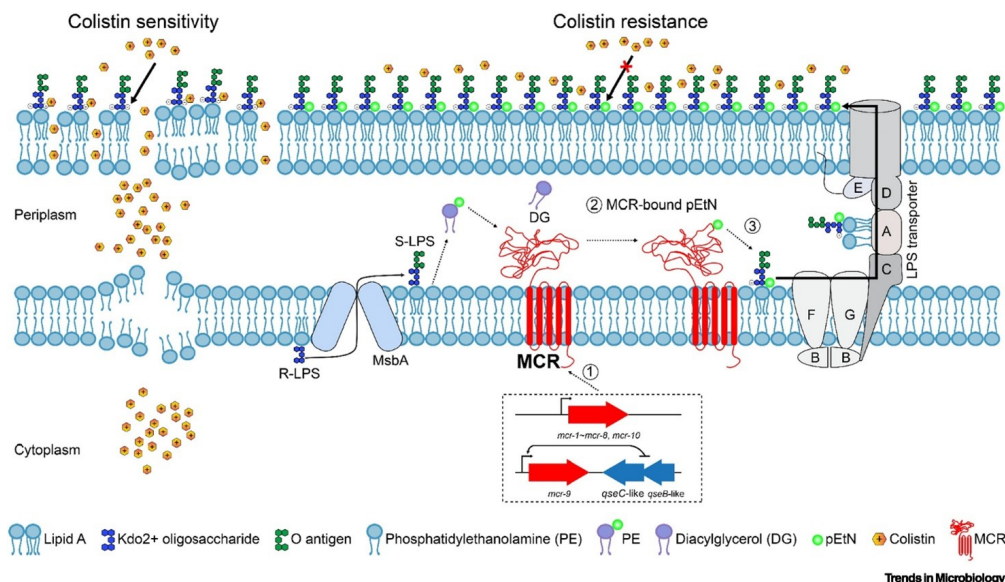


Figura 3.2: Meccanismo di resistenza alla colistina, tratta da Liu *et al.*, 2024.

Un altro esempio di modifica del target consiste nella metilazione dell'adenina nella posizione 2058 dell'RNA 50s, modifica che conferisce resistenza ai macrolidi e altri antibiotici (Weisblum, 1995). I macrolidi infatti agiscono legandosi reversibilmente all'RNA ribosomiale 23S della subunità ribosomiale 50S, bloccando l'elongazione del polipeptide. La metilazione dell'RNA ribosomiale 23S impedisce il legame dell'antibiotico.

Un ulteriore meccanismo presente nei batteri che determina resistenza agli antibiotici, oltre alla modifica del target, è la protezione del target. Questo meccanismo consiste in un insieme di processi per i quali le proteine batteriche si associano fisicamente al target dell'antibiotico, schermandolo dall'azione del farmaco. Questa protezione impedisce all'antibiotico di legarsi in modo efficace al target e di interferire con le sue funzioni. La protezione del target generalmente quindi comprende l'associazione fisica tra una proteina di protezione del target e il target stesso, in modo da impedire l'inibizione operata dall'antibiotico (Wilson *et al.*, 2020). Questo fenomeno non si realizza tramite un unico meccanismo ma esistono molteplici possibilità, tra cui l'occupazione del sito di legame dell'antibiotico, l'induzione di cambiamenti conformazionali nel target che determinano la dissociazione del farmaco da esso o l'induzione di cambiamenti conformazionali nel

target che ripristinano la sua funzionalità nonostante la presenza dell'antibiotico.

Questo meccanismo di resistenza venne identificato per la prima volta più di trent'anni fa, nel contesto della resistenza alle tetracicline (Manavathu *et al.*, 1990), e per un periodo di tempo questo rimase l'unico esempio di questo tipo di meccanismo. Studi recenti hanno però rivelato come la protezione del target rivesta un ruolo chiave nel fenomeno dell'antibiotico-resistenza e riguardi diverse classi di antibiotici, rendendo evidente la necessità di ulteriori indagini sul tema.

3.5 Inattivazione o modifica del farmaco

L'inattivazione degli antibiotici è mediata da enzimi che degradano o modificano la molecola. La degradazione enzimatica si realizza tipicamente tramite l'idrolisi del gruppo funzionale dell'antibiotico, rendendolo così inefficace, mentre la modifica del farmaco consiste nel trasferimento di vari gruppi chimici all'antibiotico, rendendolo incapace di legare il target (Wright, 2007). Questi sono meccanismi di resistenza tipici di antibiotici come gli aminoglicosidi, che vengono inattivati dalla fosforilazione, dall'acetilazione o dall'adenilazione, e dei β -lattamici, inattivati dall'idrolisi enzimatica ad opera degli enzimi beta-lattamasi (Nikaido, 2009).

3.5.1 Inattivazione degli aminoglicosidi

Antibiotici aminoglicosidici come la gentamicina o la tobramicina possono venire inattivati tramite modifiche che riducono la carica positiva netta di queste molecole policationiche. Esistono numerosi enzimi modificanti gli aminoglicosidi, tra cui AAC (3)-II, un'acetiltransferasi, oppure APH (3')-I, una fosforilasi, presente nel 46% dei batteri Gram-negativi resistenti agli aminoglicosidi.

3.5.2 Inattivazione dei beta-lattamici

La resistenza ai beta-lattamici è principalmente causata da enzimi batterici, le beta-lattamasi, che idrolizzano l'anello beta-lattamico caratterizzante questa classe di antibiotici, inattivandoli (Bush *et al.*, 2016). Alcuni di questi enzimi sono codificati su cromosomi, altri su elementi genetici mobili come i plasmidi e la loro produzione risulta essere tra i meccanismi di resistenza clinicamente più importanti per i batteri Gram-negativi. Per quanto riguarda la classificazione delle beta-lattamasi, lo schema di Ambler è il più utilizzato e raggruppa gli enzimi sulla base dell'omologia molecolare. Le classi A, C e D hanno un residuo di serina nel sito attivo, mentre gli enzimi di classe B hanno zinco nel

sito attivo e sono detti metallo-beta-lattamasi. La classe A comprende le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL, *extended-spectrum beta-lactamases*) e le carbapenemasi di *Klebsiella pneumoniae*, la classe B comprende le metallo-beta-lattamasi (NDM, Imp, e VIM), la classe C comprende le AmpC, e la classe D comprende le oxacillinasi (OXA).

Per contrastare questi enzimi sono stati individuati i cosiddetti inibitori delle beta-lattamasi, come l'acido clavulanico, che agisce come un inibitore suicida delle beta-lattamasi: esso si lega in modo irreversibile a questi enzimi, impedendo loro di distruggere l'antibiotico e di conseguenza permettendo ad esso di agire. Altri inibitori delle beta-lattamasi sono il sulbactam e il tazobactam.

3.6 Bypass del target

Il bypass del target è un meccanismo che permette ai batteri di rendere gli antibiotici inefficaci tramite lo sviluppo di vie alternative o strategie che aggirano l'inibizione determinata dal farmaco (Darby *et al.*, 2023). Ad esempio, la funzione del target può essere realizzata tramite un'altra proteina non inibita dall'antibiotico, oppure il batterio può adoperare una via metabolica che non dipende dalla proteina target del farmaco. Un'altra strategia consiste nell'overproduzione del target, di modo che la funzione complessiva sia garantita anche se alcune proteine sono effettivamente inibite dall'antibiotico. Il bypass del target è un meccanismo di resistenza che si verifica tipicamente con l'utilizzo del trimetoprim e dei sulfamidici (Then, 1982).

3.7 Meccanismi di resistenza nelle diverse classi di antibiotici

La resistenza verso ciascuna classe di antibiotici si realizza tramite meccanismi molteplici, talvolta peculiari e talvolta condivisi con altre classi (Murray *et al.*, 2021; Davies *et al.*, 2010). Per i beta-lattamici, i principali meccanismi di resistenza sono la riduzione della concentrazione intracellulare di antibiotico, tipicamente attraverso pompe di efflusso, l'alterazione del target con conseguente riduzione della capacità di legame del farmaco, e l'idrolisi dell'anello beta-lattamico attraverso le beta-lattamasi.

Per gli aminoglicosidi, la resistenza avviene tramite modifiche dell'antibiotico a opera di enzimi, mutazione del sito di legame a livello del ribosoma, ridotta concentrazione dell'antibiotico per ridotta permeabilità o aumentato efflusso.

La resistenza ai glicopeptidi (vancomicina, teicoplanina) si realizza mediante modificazioni nella biosintesi del peptidoglicano, mentre per le tetracicline i meccanismi sono

l'alterazione enzimatica dell'antibiotico, l'alterazione del target, la ridotta permeabilità al farmaco o il suo aumentato efflusso. Per i macrolidi, la resistenza ha origine dalla modifica del target o dall'inattivazione dell'antibiotico da parte di enzimi come esterasi, fosforilasi, glicosidasi, oltre che dall'aumentato efflusso. Per i lincosamidi come la clindamicina meccanismi come la modifica dell'antibiotico, l'alterazione del target e l'aumentato efflusso sono responsabili della resistenza, così come per antibiotici come il cloramfenicolo e la ciprofloxacina, un fluorochinolone. L'aumentato efflusso e l'alterazione del target sono alla base della resistenza per il trimetoprim e i sulfamidici.

Tabella 3.1: Meccanismi di resistenza nelle diverse classi di antibiotici, adattata Davies *et al.*, 2010.

Classi di antibiotici	Esempi	Meccanismi di resistenza
β -Lattamici	Penicilline, cefalosporine, carbapenemi, monobattami	Idrolisi, aumentato efflusso, alterazione del target
Aminoglicosidi	Gentamicina, streptomicina	Fosforilazione, acetilazione, nucleotidilazione dell'antibiotico, aumentato efflusso, ridotta permeabilità, alterazione del target
Glicopeptidi	Vancomicina, teicoplanina	Riprogrammazione della biosintesi del peptidoglicano
Tetracicline	Minociclina, doxiciclina	Alterazione enzimatica dell'antibiotico, aumentato efflusso, alterazione del target, ridotta permeabilità al farmaco
Macrolidi	Eritromicina, azitromicina	Idrolisi, glicosilazione, fosforilazione dell'antibiotico, aumentato efflusso, alterazione del target
Lincosamidi	Clindamicina	Modifica dell'antibiotico, aumentato efflusso, alterazione del target
Amfenicoli	Cloramfenicolo	Acetilazione dell'antibiotico, aumentato efflusso, alterazione del target
Chinoloni	Ciprofloxacina	Acetilazione dell'antibiotico, aumentato efflusso, alterazione del target
Pirimidine	Trimetoprim	Aumentato efflusso, alterazione del target
Sulfamidici	Sulfametossazolo	Aumentato efflusso, alterazione del target

3.8 Combinazione di più meccanismi di resistenza e ruolo delle pompe di efflusso

In un singolo patogeno diversi meccanismi di resistenza possono essere combinati e coordinati, aumentando di conseguenza il livello di resistenza. Questo può derivare da molteplici alterazioni in un singolo aspetto, come possono essere le mutazioni in eterozigosi di più copie dei geni del DNA ribosomiale 23S nello *S. aureus*, cosa che aumenta il livello di resistenza al linezolid (Wilson *et al.*, 2003). La maggior parte delle volte, però, l'aumentata resistenza a una specifica classe di antibiotici è il risultato di molteplici e differenti meccanismi di resistenza, ciascuno contribuente al fenotipo di resistenza complessivo. Per esempio, *P. aeruginosa* combina la modifica enzimatica all'aumentato efflusso, dimostrando così capacità di resistenza alla maggior parte degli aminoglicosidi (Wright, 2007). Inoltre, grazie alla presenza di vari meccanismi, la resistenza può estendersi a numerose classi antibiotiche ed è comune per elementi come i plasmidi contenere molteplici geni di resistenza. I più tipici meccanismi di generazione della resistenza multipla nei batteri sono infatti due: l'accumulo di molteplici geni, ciascuno codificante per la resistenza a un farmaco specifico, in una singola cellula, oppure l'aumentata espressione di geni che codificano per pompe di efflusso che permettono l'estrusione dalla cellula di vari farmaci (Nikaido, 2009). Le pompe di efflusso sono alla base del fenomeno della resistenza e molti meccanismi di resistenza dipendono o funzionano in sinergica con la resistenza intrinseca garantita dalle pompe di efflusso (Darby *et al.*, 2023). Innanzitutto, l'attività di efflusso può causare l'alterata espressione di altri geni coinvolti nell'antibiotico-resistenza. Ad esempio, negli *Enterobacterales*, la delezione o repressione del gene *acrAB*, codificante per una pompa di efflusso, tramite una successione di eventi correlati, può portare alla ridotta espressione di una proteina di membrana, OmpF, con conseguente riduzione della permeabilità di membrana e limitazione dell'accumulo di farmaco intracellulare (Saw *et al.*, 2016). In particolare, si è visto che l'inattivazione del gene o l'inibizione della proteina di efflusso determinano un aumento della resistenza di questi batteri ai carbapenemi. Questa influenza reciproca tra diversi sistemi rappresenta quindi un aspetto da considerare negli studi e trial clinici riguardanti l'inibizione delle pompe di efflusso.

Inoltre, lo stato delle pompe di efflusso influenza i tassi di evoluzione della resistenza di una popolazione di cellule: è stato dimostrato che riduzioni nella funzionalità dell'efflusso diminuiscono la frequenza con cui mutanti antibiotico-resistenti sono selezionati. L'espressione di *acrAB* (codificante per una pompa di efflusso) può variare da cellula a cellula, e cellule con una più elevata espressione del gene presentano minori livelli di espressione del gene *mutS*, codificante per un componente del sistema di *mismatch repair*

del DNA. Queste cellule presentano quindi un aumentato tasso mutazionale, perché gli errori di appaiamento vengono riparati meno, e questo permette una più rapida evoluzione di nuovi meccanismi di resistenza (Grimsey *et al.*, 2020).

Sono presenti anche evidenze relative all'ipotesi che l'efflusso influenzi il trasferimento genico orizzontale. È stato dimostrato, nel batterio *E. coli*, che in presenza delle tetracicline, inibenti la sintesi proteica, la pompa di efflusso AcrAB-TolC è necessaria per l'acquisizione del plasmide portatore di *tetA*, conferente resistenza alle tetracicline. Questo è dovuto al fatto che la pompa di efflusso riduce i livelli intracellulari di farmaco, permettendo la sintesi proteica e di conseguenza facendo sì che ci sia il tempo necessario per tradurre le proteine codificate dal plasmide (Nolivos *et al.*, 2019).

Appare quindi chiaro come le conseguenze dell'attivazione delle pompe di efflusso siano molteplici, tutte in relazione tra loro e da considerare in un'ottica di contrasto dell'antibiotico-resistenza.

Capitolo 4

Come emerge l'antibiotico-resistenza

4.1 Storia dell'antibiotico-resistenza

Anche se l'uso diffuso degli antibiotici a scopo terapeutico è iniziato meno di 100 anni fa, i meccanismi batterici di resistenza co-evolvono assieme ai composti antimicrobici naturali da miliardi di anni, come dimostrato da studi filogenetici sulle beta-lattamasi (Hall *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2011). In passato però la diffusione dei meccanismi di resistenza era limitata, poiché spesso i ceppi resistenti sono meno virulenti e meno competitivi rispetto ai ceppi sensibili.

La storia dei geni di resistenza agli antibiotici può essere studiata attraverso la ricostruzione filogenetica, ovvero la ricostruzione delle tappe che caratterizzano l'evoluzione di un gruppo sistematico di organismi. Questo tipo di analisi suggerisce appunto la presenza di geni conferenti resistenza a diverse classi di antibiotici in natura ben prima dell'avvento degli antibiotici (Aminov, 2010). Un esempio è quello delle proteine di protezione del ribosoma (RPPs), che permettono la resistenza alle tetracicline in batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Studi come quello di Kobayashi (Kobayashi *et al.*, 2007) indicano che queste proteine sono comparse in modo indipendente rispetto alla presenza delle tetracicline, nonostante vanifichino l'azione di questi antibiotici grazie alla capacità di dislocarli dal ribosoma. Gli studi filogenetici sembrano dimostrare che queste proteine si sono evolute a partire da fattori di allungamento (*elongation factors*, EF), proteine cruciali nella sintesi proteica, in modo particolare durante la fase di allungamento della catena polipeptidica. I risultati degli studi di Kobayashi indicano che i predecessori di queste RPPs si sono sviluppati prima dell'apparizione degli streptomiceti, i batteri produttori di tetracicline. Si pensa quindi che queste proteine si siano evolute in modo indipendente rispetto alla presenza di questi antibiotici e che avessero una funzione di-

versa da quella di resistenza alle tetracicline. Si ipotizza infatti che potessero, e possano tutt'ora, conferire protezione anche contro altre sostanze chimiche presenti nell'ambiente. Si potrebbe argomentare che la produzione di tetracicline potrebbe essersi verificata in specie batteriche ancestrali prima della comparsa dei moderni batteri produttori di queste sostanze e che i geni conferenti questa capacità siano stati poi silenziati o persi, ipotesi derivante dal fatto che la produzione di molecole antimicrobiche può infatti essere genericamente utilizzata dai batteri come strumento per sopprimere la crescita o uccidere altri microrganismi suscettibili. La sintesi di tetracicline però necessita di molteplici passaggi complessi e questo indebolisce l'ipotesi secondo cui la produzione di tetracicline sia emersa varie volte nella storia e che i geni conferenti questa abilità siano comparsi e poi siano stati silenziati o persi. Al giorno d'oggi, quindi, solo gli streptomiceti sono riconosciuti come organismi produttori di tetracicline.

Per queste ragioni si suppone che le proteine di protezione del ribosoma siano comparse prima della produzione di tetracicline, evolvendosi in modo indipendente da queste. Questo è supportato anche dal fatto che le RPPs sono presenti in batteri di varie nicchie ecologiche, tra cui gli ambienti marini, dove sussistono contatti molto limitati con gli streptomiceti del suolo.

Anche per quanto riguarda le beta-lattamasi gli studi di filogenetica fanno risalire la comparsa di questi enzimi a più di due miliardi di anni fa (Aminov, 2010) e lo studio di sedimenti di 10 000 anni fa indica che la diversità presente tra i vari tipi di questi enzimi è il risultato di un'evoluzione non recente ma piuttosto antica.

Altri studi si sono concentrati non sulle molecole conferenti resistenza ma sugli antibiotici stessi, e hanno determinato come anche i componenti strutturali di alcuni antibiotici siano esistenti da milioni di anni. Si stima che la via biosintetica per molecole come l'eritromicina si sia evoluta circa 800 milioni di anni fa (Davies *et al.*, 2010).

È evidente quindi come la presenza di geni conferenti resistenza sia svincolata dall'uso degli antibiotici. È con l'introduzione di questi farmaci nella pratica clinica che la pressione selettiva sui microrganismi è aumentata drasticamente, determinando un'accelerazione considerevole nell'evoluzione e nella diffusione delle resistenze nei batteri. I primi ceppi resistenti sono apparsi negli ospedali, dove l'uso di antibiotici era maggiore. Ceppi di *Streptococcus pyogenes* resistenti ai sulfamidici vennero identificati infatti negli ospedali a partire dal 1930 (Levy *et al.*, 2004) e nel 1944 vennero isolati ceppi penicillino-resistenti di *Staphylococcus aureus*, solo due anni dopo dell'introduzione dell'antibiotico sul mercato (Kirby, 1944). Un trend simile è stato poi osservato per praticamente tutti gli antibiotici sviluppati fino ad oggi: la resistenza viene documentata già pochi anni dopo l'inizio dell'uso clinico e la proporzione di ceppi resistenti aumenta nel tempo. Casi

di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti alla streptomina si verificarono poco dopo la scoperta di questo antibiotico, come riportato dagli studi di Crofton e Mitchison (Crofton *et al.*, 1948) e tra la fine degli anni '50 del Novecento e l'inizio degli anni '60 vennero identificate resistenze a molteplici antibiotici tra enterobatteri come *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*. Questi ceppi determinarono complicanze cliniche e morti, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, ma il fenomeno della resistenza venne inizialmente percepito come un problema sanitario minore relativo a batteri gastrointestinali in Paesi non occidentali. Questo punto di vista cambiò negli anni '70, quando ceppi di *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, organismi causanti rispettivamente infezioni respiratorie e genitourinarie, divennero resistenti all'ampicillina e, nel caso dell'*Haemophilus*, anche al cloramfenicolo e alle tetracicline (Elwell *et al.*, 1977; Van Klingeren *et al.*, 1977; Levy *et al.*, 2004). Alimentati dall'incrementato uso di antibiotici, i tassi di resistenza aumentarono in molte specie batteriche diverse, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo dove questi farmaci erano prontamente disponibili anche senza prescrizione (Levy *et al.*, 2004).

Inizialmente, la resistenza interessava un singolo antibiotico o una singola classe, ma i primi fenomeni di multiresistenza vennero osservati negli enterobatteri alla fine degli anni '50 (Fernández *et al.*, 2012) e da allora sono in costante aumento. Dagli anni '80 i casi di tubercolosi sono sempre più spesso a opera di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente ed è da evidenziare il fatto che questo fenomeno è favorito dalla coinfezione tra micobatterio e HIV (Mesfin *et al.*, 2014). Le ragioni di questa associazione sono molteplici: le persone con HIV sono più esposte al contatto con individui con tubercolosi resistente, a causa dell'ospedalizzazione in strutture con ridotto controllo delle infezioni o della maggiore presenza dei due patogeni in ambienti come le carceri. Inoltre, le persone con immunodeficienza progrediscono dallo stato di tubercolosi latente allo stato di infezione attiva più velocemente delle persone immunocompetenti, e i pazienti con HIV presentano un alterato assorbimento di farmaci come la rifampicina e l'etambutolo, contribuendo alla genesi di resistenze e al fallimento del trattamento per la tubercolosi (Andrews *et al.*, 2010; Mesfin *et al.*, 2014).

È evidente quindi come l'emergenza delle resistenze agli antibiotici sia un processo in continua evoluzione e che esse si sviluppino parallelamente al loro uso. Utilizzo di antibiotici e emergenza delle resistenze sono due fenomeni strettamente correlati tra loro, che per questo vanno studiati assieme e affrontati da un punto di vista più ampio rispetto al mero contrasto delle singole resistenze man mano che queste si affermano.

4.2 Antibiotico-resistenza intrinseca, acquisita e adattativa

Dal punto di vista della genesi, l'antibiotico-resistenza può essere naturale, detta anche intrinseca, oppure può essere acquisita. Un terzo tipo meno frequente di resistenza, trattato comunque in seguito, è la resistenza adattativa. La resistenza intrinseca si verifica quando il batterio è resistente a un antibiotico per caratteristiche proprie, mentre è detta acquisita quando il batterio si adatta a resistere ad un antibiotico mediante modifiche del proprio patrimonio genetico indotte da varie cause (Aifa, 2018).

Un esempio di resistenza intrinseca è quella conferita da una membrana esterna con una bassa permeabilità, come accade per batteri quali *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*, oppure può essere data dalla presenza di pompe di efflusso espresse costitutivamente (Fernández *et al.*, 2012). Nel 1994 furono raccolti i primi dati a favore delle pompe di efflusso come meccanismo di resistenza intrinseca in *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 1994). L'anno precedente era stato descritto un operone (unità funzionale del DNA contenente geni che codificano per proteine coinvolte in una specifica via metabolica, insieme a sequenze regolatrici che controllano la loro espressione) codificante per un sistema di efflusso sempre in *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993) ed era stato dimostrato come la delezione dei geni componenti questo sistema conferisse aumentata suscettibilità a svariati agenti antimicrobici. Successivamente è stato appurato come l'efflusso permetta ai batteri Gram-negativi resistenza verso certe classi di antibiotici. Ad esempio, macrolidi come l'eritromicina hanno bassa o nessuna attività contro *E. coli* e *H. influenzae* per questo motivo (Piddock, 2006).

Nella resistenza acquisita invece un batterio originariamente suscettibile diventa resistente come risultato di mutazioni o dell'incorporazione di nuovo materiale genetico tramite plasmidi, trasposoni, integroni o DNA nudo. Anche se alcuni eventi mutazionali possono determinare un marcato incremento della MIC (minima concentrazione inibente), solitamente essi conferiscono all'organismo un basso livello di resistenza. Queste lievi variazioni nella MIC sono difficili da individuare e sono spesso non rilevate durante l'analisi dei campioni, ma un numero crescente di autori sostiene che i bassi livelli di resistenza possano comunque avere un ruolo decisivo nel graduale incremento delle resistenti globali, in particolare nell'aumento nel tempo della MIC (Baquero, 2001; Fernández *et al.*, 2011). Va quindi ribadito che anche un lieve aumento della MIC dovrebbe allertare i microbiologi negli ospedali, in quanto una resistenza lieve può diventare più significativa. Anche se un ceppo viene ancora classificato come suscettibile, la sua diminuita sensibilità al farmaco potrebbe precedere l'emergenza di un più alto livello di resistenza e dovrebbe stimolare gli sforzi volti a regolare l'uso di quell'antibiotico verso cui sta diminuendo la

suscettibilità.

Un terzo tipo di resistenza è la resistenza adattativa (*adaptive resistance* in inglese), un fenomeno relativamente poco studiato che consiste nel temporaneo incremento della capacità di un batterio di sopravvivere all'azione dell'antibiotico attraverso alterazioni dell'espressione genica come risultato dell'esposizione a fattori ambientali. Questi possono essere lo stress, la disponibilità di nutrienti, il tasso di crescita e le concentrazioni sub-inibitorie di antibiotici (Fernández *et al.*, 2012). In contrasto rispetto ai meccanismi di resistenza intrinseca e acquisita, che sono stabili e possono essere trasmessi per via verticale alle generazioni successive, la resistenza adattativa ha natura transiente e solitamente viene revocata alla rimozione delle condizioni che l'hanno indotta.

4.3 Emergenza e acquisizione dei meccanismi di resistenza

Nella trattazione di come emergono le caratteristiche che conferiscono un fenotipo resistente ai batteri e della loro affermazione nelle popolazioni microbiche va fatta una distinzione tra i tre tipi di resistenza. Si tratterà quindi prima dell'emergenza dei meccanismi di resistenza acquisita e successivamente di quelli di resistenza adattativa. Per la resistenza intrinseca non avviene una vera e propria “emergenza” della caratteristica di resistenza, perché questa è propria del batterio già di per sé. È possibile però che vengano selezionate popolazioni presentanti delle amplificazioni dei geni interessati, dato che questo, in presenza di una pressione selettiva, costituisce un vantaggio (Davies *et al.*, 2010).

4.3.1 Resistenza acquisita: resistenza mutazionale

In contrapposizione all'acquisizione di resistenza tramite elementi genetici mobili (trattati in seguito), i quali tipicamente conferiscono alti livelli di resistenza, la capacità di non risentire dell'azione degli antibiotici può essere determinata da mutazioni sequenziali nei cromosomi, che col tempo portano da bassi livelli a alti livelli di resistenza. Questo tipo di resistenza acquisita, basata appunto sull'accumulo progressivo di mutazioni, è detta resistenza mutazionale (Levy *et al.*, 2004). Questo processo è stato responsabile dell'iniziale emergenza di resistenze verso la penicillina e le tetracicline in *N. gonorrhoeae* (i ceppi batterici hanno poi acquisito trasposoni conferenti alti livelli di resistenza). Anche ceppi di *E. coli* e altri enterobatteri hanno sviluppato resistenza ai fluorochinoloni come risultato di mutazioni negli enzimi target di questa classe di antibiotici, le topoisomerasi, oltre che dall'aumentata espressione di pompe di efflusso. Uno studio diretto da H.

Wang (Wang *et al.*, 2001) ha individuato molteplici mutazioni nei geni *gyrA/B* e *parC* codificanti per le topoisomerasi responsabili di resistenza ai chinoloni. Inoltre tramite amplificazione con PCR del gene *acrR*, regolatore di una pompa di efflusso multifarmaco, sono state isolate mutazioni, delezioni e duplicazioni responsabili dell'aumentata espressione di questa proteina con conseguente resistenza ad alcuni antibiotici.

Ceppi di *S. aureus* con mutazioni cromosomiali conferenti resistenze alla vancomicina apparvero in risposta all'uso di questo antibiotico e solo successivamente si affermarono gli alti livelli di resistenza portati tramite trasposoni dagli enterococchi (Levy *et al.*, 2004).

La resistenza mutazionale, di cui trattano gli esempi appena riportati, si genera dalla comparsa spontanea di mutazioni nel corso della replicazione del DNA, processo che può essere più o meno pronò agli errori. Queste mutazioni e la variabilità fenotipica che ne deriva sono alla base dell'evoluzione delle popolazioni batteriche e conferiscono loro l'abilità di adattarsi alle pressioni selettive determinate dall'ambiente circostante. A seconda della specifica natura delle sfide dell'ambiente esterno, infatti, determinate mutazioni risulteranno essere vantaggiose per la cellula. Anche se alcuni cambiamenti che conferiscono resistenza agli antibiotici sono svantaggiosi per quanto riguarda la crescita e la virulenza, nel contesto della pressione posta dalla terapia antibiotica queste mutazioni risultano essenziali per la sopravvivenza e di conseguenza vengono selezionate. Queste mutazioni sono poi trasmesse alle generazioni successive e sono generalmente stabili, in particolare in presenza della pressione selettiva data dagli antibiotici. Si possono poi verificare ulteriori mutazioni che possono risolvere eventuali riduzioni della crescita o della virulenza determinate dalla mutazione iniziale, rendendo il patogeno ancora più competitivo nei confronti degli altri organismi e pericoloso per il paziente.

È interessante notare che la rimozione della pressione selettiva determinata dalla diminuzione o cessazione dell'uso di un antibiotico può determinare minori livelli di resistenza ma appena si reintroduce il farmaco questi livelli tendono a ritornare allo stato precedente la sospensione del farmaco (Fernández *et al.*, 2012).

Driver mutazionali nei batteri

Un meccanismo comune generante resistenza agli antibiotici nei batteri è appunto costituito dall'insorgenza di mutazioni nel genoma batterico. Come queste mutazioni emergano è ancora poco chiaro, si sa tuttavia che le mutazioni forniscono la diversità genica su cui opera la selezione naturale e che permettono l'adattamento a nuovi ambienti (Carvajal-Garcia *et al.*, 2023). Anche se le mutazioni sono per la maggior parte dannose, tutti gli organismi hanno un tasso di mutazione basale che permette loro di evolvere. Molteplici

processi sono noti per contribuire alla mutagenesi spontanea: errori nella replicazione, alterazioni nella trascrizione, danni spontanei al DNA che portano a riparazioni errate. Quale sia il meccanismo principale che porta alle mutazioni e che guida l'evoluzione non è ancora stato però determinato.

Un'importante fonte di mutazioni è sicuramente costituita dai danni al DNA. Alcune forme di danni al DNA sono la deaminazione delle citosine, la depurinazione, ovvero la perdita di una base azotata purinica (adenina o guanina) da un nucleotide per rottura di un legame glicosidico e le rotture a singolo filamento, che possono diventare rotture a doppio filamento. È importante studiare i meccanismi di danno al DNA perché sono questi processi quelli che in ultima istanza porteranno alla generazione di mutazioni, assieme agli errori spontanei della polimerasi. Un meccanismo di mutagenesi è quello associato alla risposta allo stress, studiato da J. M. Moore e dai suoi collaboratori (Moore *et al.*, 2017). Secondo i loro studi, la mutagenesi può essere indotta da fattori di stress e favorirebbe un aumentato adattamento a fattori esterni. Si è visto che in *E. coli* la riparazione delle rotture del DNA a doppio filamento può generare mutazioni quando vengono utilizzate delle DNA polimerasi a bassa fedeltà in risposta a condizioni di stress (nella cosiddetta risposta allo stress, *stress response* in inglese). Questa via favorisce e permette l'azione delle DNA polimerasi IV (DinB), II e V, più prone agli errori. Si precisa che l'upregolazione di queste polimerasi non è sufficiente per generare mutazioni, ma è necessario un pre-esistente danno alle basi al DNA, causato tipicamente delle specie reattive dell'ossigeno. Si ipotizza che il danno alle basi possa inibire la progressione della DNA polimerasi ad alta fedeltà, permettendo l'azione delle DNA polimerasi prone agli errori e di conseguenza la generazione di mutazioni. Come si evince anche dagli studi di Carvajal-Garcia (Carvajal-Garcia *et al.*, 2023), lo stress ossidativo è infatti considerato una delle principali fonti di danno endogeno al DNA nei batteri. Esso è una conseguenza dei processi metabolici e deriva dal disequilibrio tra molecole ossidanti molto reattive, come le specie reattive dell'ossigeno, e l'abilità della cellula di neutralizzarle. Nei suoi studi, Carvajal-Garcia ha dimostrato come lo stress ossidativo endogeno sia uno dei driver principali della mutagenesi che poi permette lo sviluppo dell'antibiotico-resistenza. In particolare, un processo di riparazione del DNA molto conservato, la riparazione associata alla trascrizione, è alla base della mutagenesi dipendente dallo stress ossidativo. Questo tipo di riparazione è un meccanismo specializzato che permette di riparare i danni al DNA in geni attivamente trascritti. Quando l'RNA polimerasi, l'enzima che trascrive il DNA in RNA, incontra un danno al DNA durante la trascrizione, il processo si blocca, segnalando la presenza di un problema. Questo blocco innesca il reclutamento di enzimi specifici che riparano il danno, permettendo alla RNA polimerasi di riprendere la trascrizione. In

questo processo agiscono tre diverse polimerasi mutageniche, causative di alterazioni nella sequenza genica e conseguenti alterazioni del fenotipo batterico.

Come già trattato nel Capitolo 3, anche il sistema di *mismatch repair* del DNA, se meno funzionante, può determinare un aumento del tasso mutazionale di una cellula.

In generale, quindi, sia gli agenti mutageni sia i deficit nei meccanismi di riparazione del DNA costituiscono gli eventi alla base delle mutazioni provocanti cambiamenti nel fenotipo batterico, variabilità su cui poi agisce la selezione naturale.

Va però precisato che mutazioni generanti resistenza possono avere anche altri ruoli per la cellula, come visto per le mutazioni nelle proteine di protezione del ribosoma. Diverse pressioni selettive possono portare a mutazioni che per coincidenza o per affinità di funzione conferiscono anche resistenza all'antibiotico. Quindi un fenotipo di resistenza non compare necessariamente solamente in risposta alla pressione selettiva data dal farmaco ma la sua emergenza può comunque favorire una popolazione batterica in presenza di antibiotico (Davies *et al.*, 2010). Infatti anche in altri studi, come in quello di G. D. Wright, si afferma che le analisi biochimiche hanno rilevato che l'antibiotico-resistenza si è generata da precursori proteici con altre funzioni metaboliche. La potente pressione selettiva prodotta dall'uso di agenti antimicrobici ha poi stimolato la selezione dei meccanismi di resistenza a partire da questi precursori (Wright, 2007). Un altro esempio a proposito di questo concetto è costituito dalla resistenza determinata dai geni *gnr*, che conferiscono resistenza ai chinoloni e sono stati acquisiti da batteri acquatici. Il ricercatore Rustam Aminov (Aminov, 2010) ha riassunto l'origine evolutiva di questi geni: si suppone che la funzione originaria di uno degli omologhi, MfpA, fosse quella di garantire assistenza al ripiegamento del DNA, soprattutto durante i periodi di senescenza replicativa, e mantenere condensata la cromatina. Questo enzima è poi risultato essere protettivo contro l'azione di questi antibiotici e una volta che il gene codificante è entrato nell'ambiente costituito dal microbiota umano o animale, attraverso un elemento genetico mobile, la forte pressione selettiva data dall'uso dei chinoloni ha favorito la sua amplificazione e disseminazione tra i batteri commensali e patogeni.

Interazione tra mutazioni e selezione naturale: esiste il finalismo in biologia?

Con finalismo si intende una dottrina filosofica, opposta al meccanicismo, secondo cui tutto tende verso un fine ultimo e per cui ogni fenomeno nella sua connessione con gli altri fenomeni cospira verso l'attuazione di determinati fini (Oxford Languages, 2025). Pensando a come i batteri riescono a evolvere meccanismi di resistenza praticamente per ogni antibiotico immesso sul mercato, si potrebbe essere erroneamente indotti a credere

che essi si evolvano con questo fine, ovvero che le mutazioni che si verificano abbiano questo scopo, ma non è così. Come scrive il filosofo della scienza Telmo Pievani (Pievani, 2024, p.33):

Le mutazioni genetiche non sono “casuali” dal punto di vista chimico (sono errori di copiatura del DNA indotti da agenti esterni, detti appunto mutageni), quindi non sono accidentali perché misteriosamente prive di cause, ma perché i loro effetti non sono prevedibili rispetto alla funzionalità della proteina corrispondente. In sostanza, le mutazioni non emergono “in vista di” o “per” gli effetti che avranno: emergono e basta - in modo spontaneo, come diceva Charles Darwin - a causa di loro ragioni intrinseche, e poi casualmente possono avere effetti negativi, qualche volta positivi, oppure assai spesso neutrali, cioè ininfluenti.

— Telmo Pievani, 2024, p. 33

Un'altra considerazione importante che fa Pievani, e che va tenuta a mente, riguarda l'evoluzione e la selezione naturale: l'evoluzione è un processo cumulativo di adattamento a circostanze mutevoli (Pievani, 2024, p.37) e la selezione naturale è un meccanismo statistico del tutto cieco, non è un agente intenzionale (p.43). Essa inoltre non riparte ogni volta da zero ma parte da ciò che è già funzionale e filtra le varianti possibili (p.37). Questo concetto di “modifiche progressive” è infatti alla base di quanto trattato in precedenza, ovvero la possibilità di mutazioni consecutive che determinano progressivamente un graduale aumento della capacità di resistenza.

4.3.2 Resistenza acquisita: trasferimento genico orizzontale

Con trasferimento genico orizzontale (TGO) si intende la trasmissione di materiale genetico tra organismi in modo diverso rispetto alla classica ereditarietà verticale da organismo genitore a organismi figli. I tre meccanismi classici di TGO sono la trasformazione, la coniugazione e la trasduzione (Arnold *et al.*, 2022). Inoltre, in aggiunta a questi classici meccanismi esistono anche altre modalità di trasferimento di materiale genetico tra i batteri, che stanno venendo studiate solo negli ultimi anni. Queste sono il trasferimento attraverso vescicole di membrana, mediante “nanotubi” o attraverso organismi “*phage-like*”, ovvero simili a fagi. In questa trattazione ci si concentrerà però solamente sulle tre modalità principali e più frequenti.

La trasformazione è il processo con cui i batteri assumono frammenti di DNA nudo dall'ambiente e li incorporano nel loro genoma, mentre la coniugazione consiste in una trasmissione unidirezionale di DNA da una cellula donatrice a una ricevente attraverso il

pilo sessuale, un'appendice filamentosa cava che forma un ponte citoplasmatico attraverso cui avviene il trasferimento del DNA. Il tipo di accoppiamento della cellula dipende dalla presenza o assenza di un plasmide coniugativo, ad esempio il plasmide F di *E. coli*. Con plasmide si intende una molecola di DNA circolare a doppio filamento, presente nel citoplasma dei batteri e capace di replicarsi indipendentemente dal cromosoma. All'interno di un plasmide possono essere presenti anche uno o più trasposoni, segmenti di DNA capaci di spostarsi tra il cromosoma batterico e i plasmidi, e in generale all'interno del genoma di eucarioti e procarioti, creando variabilità genetica. Il plasmide F (*Fertility*) è definito coniugativo perché contiene tutti i geni necessari al proprio trasferimento, compresa la capacità di produrre pili sessuali e di iniziare la sintesi di DNA all'origine del trasferimento del plasmide (Murray *et al.*, 2021). La trasduzione è invece una modalità di trasferimento genetico mediata da virus batterici (detti batteriofagi) che raccolgono frammenti di DNA e li trasferiscono alle cellule infettate, che li incorporano nel proprio genoma batterico.

In seguito ai processi di trasformazione, coniugazione e trasduzione la successiva incorporazione del DNA estraneo nel cromosoma avviene per ricombinazione. La ricombinazione omologa avviene tra sequenze di DNA altamente correlate e in genere porta alla sostituzione di una sequenza con un'altra, mentre la ricombinazione non omologa avviene tra sequenze di DNA dissimili e in genere produce inserzioni o delezioni o entrambe. Al fine di comprendere le conseguenze del trasferimento genico orizzontale sulle capacità di una popolazione batterica di resistere a una pressione selettiva (trattate nel Capitolo 5) è quindi utile distinguere tra la ricombinazione che risulta in un trasferimento di alleli (AT), nella quale un allele è sostituito da un altro e non c'è perdita o acquisizione di DNA cromosomico, e il trasferimento genico (GT) in cui il numero o il tipo di geni nel genoma viene alterato.

4.3.3 Resistenza adattativa

Come scritto precedentemente, la resistenza adattativa è un fenomeno transiente che si verifica in risposta a variazioni dell'ambiente circostante. I batteri possono infatti modificare la loro espressione genica molto rapidamente, aumentando così le loro possibilità di sopravvivenza in presenza di minacce esterne come l'uso di antibiotici. Esistono molti fattori ambientali che possono portare alla temporanea acquisizione di resistenza a un antibiotico, tra cui variazioni nella concentrazione ionica o nella temperatura e, soprattutto, l'esposizione a dosi non letali di antimicrobici, come riporta Fernández (Fernández *et al.*, 2012). Insieme ai bassi livelli di resistenza mutazionale, la resistenza adattativa

è una delle cause dell'aumento progressivo della MIC a cui si sta assistendo al giorno d'oggi. Un esempio di resistenza adattativa consiste nell'espressione di geni codificanti per porine o pompe di efflusso in risposta a segnali esterni, fenomeno trattato nel Capitolo 3 relativamente all'espressione delle pompe di efflusso in presenza di tetracicline. Si sottolinea quindi come la resistenza del batterio possa variare di molto anche in base alle condizioni extracellulari.

4.4 Ruolo dell'ambiente e delle interazioni tra microrganismi

Un approccio innovativo riguardo alla resistenza agli antibiotici consiste nello studio di questo fenomeno nel contesto delle comunità microbiche. Infatti grazie alle pubblicazioni più recenti inizia ad essere evidente come le interazioni intra- e interspecie influenzino il modo in cui gli organismi rispondono alla pressione selettiva data dagli antibiotici e si evolvono in risposta ad essa. Uno studio in particolare, quello di M. J. Bottery e dei suoi collaboratori (Bottery *et al.*, 2021), si è concentrato sul ruolo delle interazioni batteriche interspecie in merito alla selezione delle resistenze. Infatti una visione alternativa di questo problema consiste nel considerare la resistenza a un antibiotico non come un tratto indipendente proprio di uno specifico ceppo batterico, ma come la proprietà complessiva di una comunità microbica. Si è visto infatti che una popolazione batterica può sopravvivere a un trattamento antibiotico anche senza essere portatrice dei geni di resistenza. Si parla infatti di tolleranza, ovvero l'abilità della popolazione batterica di sopravvivere all'esposizione transiente a un'alta concentrazione di antibiotico senza che ci sia un cambiamento nella MIC, la minima concentrazione inibitoria. Questo è stato determinato dagli studi di Brauner, Fridman, Gefen e Balaban (Fridman *et al.*, 2016). Essi infatti hanno distinto la resistenza, ovvero «l'abilità ereditata di un microrganismo di crescere ad alte concentrazioni di un antibiotico, indipendentemente dalla durata del trattamento», quantificata tramite la MIC, e la tolleranza, ossia «l'abilità, ereditata o meno, di un microrganismo di sopravvivere a un'esposizione transiente a un'alta concentrazione di antibiotico senza cambiamenti nella MIC». Questa è di solito acquisita tramite il rallentamento di processi essenziali nella cellula. Questa caratteristica infatti è spesso mediata da cambiamenti nello stato fisiologico delle cellule di una popolazione in risposta al contesto ambientale esterno, come può essere la scarsità di risorse, l'interazione col sistema immunitario dell'ospite o, appunto, le interazioni con le altre specie batteriche. La persistenza invece è rappresentata dall'abilità di una sottopopolazione

di cloni batteri di entrare in uno stato di dormienza, permettendo la sopravvivenza ad alte concentrazioni di antibiotici mentre il resto della popolazione viene uccisa. Sia la tolleranza che la persistenza permettono ai batteri sopravvissuti di riprendere la crescita una volta cessata la presenza del farmaco.

Una considerazione interessante, trattata nell'articolo di Bottery, è che le interazioni tra le specie possono alterare la risposta agli antibiotici, in particolare tramite tre modalità: la resistenza collettiva, costituita da interazioni in una comunità che aumentano l'abilità dei membri di resistere all'azione dell'antibiotico, la tolleranza collettiva, ossia interazioni inter-comunità che alterano lo stato delle cellule, ad esempio rallentandone il metabolismo in modo da diminuire il tasso di morte, e la protezione dall'esposizione, ovvero la riduzione della concentrazione dell'antibiotico in modo da proteggere tutti i membri della comunità.

Alcuni esempi di questo tipo di meccanismi, di cui beneficiano tutti gli elementi della popolazione, sono l'inattivazione enzimatica degli antibiotici (infatti le conseguenze positive ricadono non solo sul produttore degli enzimi, ma su tutta la comunità) o la formazione di un biofilm che protegga dalla penetrazione dall'antibiotico al suo interno. Questo biofilm, formato dai batteri di una determinata specie, può fornire protezione anche a batteri di altre specie e questo si verifica tipicamente nelle infezioni polimicrobiche ospedaliere, costituendo un problema sanitario significativo.

È chiaro quindi come le interazioni tra le specie abbiano profonde implicazioni per quanto riguarda l'antibiotico-resistenza e che questo dovrebbe essere tenuto conto dal clinico nella scelta dell'antibiotico, oltre che dal microbiologo quando fornisce le indicazioni in merito alla terapia suggerita. Infatti solitamente la sensibilità di un batterio all'antibiotico viene determinata da misurazioni effettuate su colture pure ma spesso questi dati possono non coincidere con quelli inerenti la sensibilità dello stesso patogeno nel contesto di una infezione polimicrobica. Bottery e colleghi propongono delle strategie per comprendere ed affrontare l'antibiotico-resistenza nel contesto di una comunità microbica, come eseguire i test di suscettibilità sull'intera comunità e non solo sulla popolazione d'interesse, oppure tenere conto delle conseguenze dell'antibiotico sul funzionamento e le dinamiche dell'intera comunità. In generale, l'approccio consigliato è quello di concentrarsi sulla comunità e non sul singolo patogeno in quanto è probabile che la presenza di altri microrganismi alteri le dinamiche della selezione e che possa fornire geni di resistenza.

4.4.1 Protezione reciproca tra microrganismi e relativa funzione in un'ottica evolutiva

Studi recenti riguardo all'antimicrobico-resistenza (Lee *et al.*, 2010) hanno indagato il concetto della "selezione parenterale" o "selezione di parentela", *kin selection* in inglese, termine coniato dal biologo e genetista John Maynard Smith. Con selezione parenterale si intende la teoria evoluzionistica secondo cui comportamenti altruistici, che favoriscono la riproduzione di individui imparentati, possono evolvere grazie al vantaggio che essi conferiscono alla trasmissione dei geni condivisi. Secondo questo concetto un individuo può sacrificare una parte del proprio successo riproduttivo per aiutare i parenti, aumentando così le probabilità di sopravvivenza e riproduzione dei geni che condividono.

È stato dimostrato da Lee e dai suoi collaboratori, infatti, che in una coltura di *E. coli* pochi mutanti altamente resistenti migliorano la sopravvivenza dei membri meno resistenti della comunità. Questo avviene tramite la produzione dell'indolo, una molecola di segnalazione generata da cellule in attiva crescita in assenza di fattori di stress. Tramite lo studio del profilo trascrizionale delle cellule, i ricercatori hanno scoperto che l'indolo attiva le pompe di efflusso e i meccanismi di protezione dallo stress ossidativo. Questo risulta essere quindi un meccanismo di resistenza a livello di popolazione, costituente una forma di selezione parenterale: un piccolo numero di mutanti resistenti fornisce protezione alle altre cellule, più vulnerabili. Questo comporta dei costi per gli organismi produttori (la produzione dell'indolo comporta un utilizzo di risorse che gli individui non produttori non devono sostenere) ma aumenta le capacità di sopravvivenza della popolazione complessiva. Questo è proprio il concetto alla base di questo tipo di comportamento che, va ricordato, non è "voluto" ma è un prodotto della selezione naturale e pertanto deve essere risultato vantaggioso. Questo comportamento "altruistico" potrebbe sembrare paradossale da un punto di vista biologico dato che, come riportato nell'esempio, chi mette in pratica l'atto altruistico si priva di risorse per donarle agli altri e così facendo diminuisce le sue probabilità di sopravvivenza e riproduzione. Se l'individuo portatore dei geni che inducono questo comportamento sopravvive e si riproduce di meno, i geni che favoriscono i comportamenti altruistici dovrebbero essere eliminati nel giro di poche generazioni. Ciò però non accade se i geni in questione facilitano la riproduzione di altri organismi con lo stesso gene: in questo modo è favorita la riproduzione delle copie dello stesso gene nei consanguinei e la presenza del gene, o dei geni, si mantiene nelle generazioni successive.

Un altro esempio di questo tipo di comportamento è costituito dalla produzione del biofilm che impedisce la penetrazione degli antibiotici. In questo caso, come nel caso in cui

le pompe di efflusso riducono la concentrazione di antibiotici in un contesto polimicrobico, la protezione è estesa a tutti i membri della comunità, indipendentemente dall'affinità genetica. Questa cooperazione tra individui non geneticamente correlati rimane però vantaggiosa se il comportamento cooperativo fornisce comunque un vantaggio diretto (la protezione dall'antibiotico) all'individuo che mette in atto il comportamento, e se questo vantaggio supera il costo del comportamento in sé (West *et al.*, 2006). In generale, si sottolinea ancora una volta quanto il fenomeno della resistenza sia complesso e dipendente dalle interazioni tra microrganismi diversi e pertanto vada studiato non solo in un'ottica di specie ma piuttosto considerando la comunità polimicrobica nel suo insieme.

Capitolo 5

Rapporto tra antibiotico-resistenza ed evoluzione: meccanismi evolutivi influenzanti il mantenimento delle resistenze

5.1 Impatto delle mutazioni di resistenza sulla fitness

La comparsa dell'antibiotico-resistenza nei batteri è determinata sostanzialmente dal tasso con cui si verificano mutazioni *de novo* e dal trasferimento genico orizzontale di elementi genetici mobili portanti geni di resistenza. Nel contesto di un'infezione è verosimile anche che la dimensione della popolazione batterica dell'ospite sia grande abbastanza da includere già mutanti resistenti pre-esistenti (Durão *et al.*, 2018). Considerando che una popolazione batterica nell'ospite può anche arrivare ad avere 10^{10} unità e che le mutazioni da sostituzione di basi possono avere un tasso di frequenza di 10^{-9} - 10^{-10} per nucleotide per generazione, è possibile che le mutazioni conferenti resistenza siano già esistenti una popolazione prima dell'applicazione dell'antibiotico. Nei suoi studi P. Durão infatti sostiene che il tasso di mutazione *de novo* abbia un'influenza limitata sull'emergenza della resistenza, proprio perché spesso le mutazioni responsabili sono già presenti nella popolazione.

Se una popolazione è sottoposta alla pressione data da un antibiotico, la probabilità che la mutazione conferente resistenza (già presente nella popolazione, oppure comparsa *de novo* o acquisita tramite elementi genetici mobili) non scompaia ma al contrario au-

menti di frequenza nella popolazione dipende dal suo effetto sulla fitness. Con fitness si fa riferimento al successo di un organismo nell'ambiente per quanto riguarda sopravvivenza e capacità riproduttiva, considerando che il successo riproduttivo è misurato in termini di rappresentanza genetica, ovvero quanto un patrimonio genetico è rappresentato nella popolazione nel tempo.

Nei batteri la fitness relativa tra due genotipi è misurata confrontando genotipo resistente e genotipo sensibile e valutando il cambiamento della frequenza dei rispettivi genomi nel tempo, distinti in base alla presenza o meno della mutazione di resistenza. Un altro modo per misurare la fitness nei batteri consiste poi nella valutazione dei tratti relativi alla riproduzione, come il tasso di crescita della popolazione.

Se la popolazione batterica non è sottoposta a pressione selettiva data dall'antibiotico, la frequenza nel tempo della mutazione conferente resistenza dipenderà dall'equilibrio tra la velocità di replicazione dei batteri aventi la mutazione (ovvero il loro successo riproduttivo) e il tasso di eliminazione a opera della selezione naturale, considerando l'eventuale effetto deleterio sulla fitness dovuto alla mutazione, detto "costo della resistenza". Come precisazione, va detto anche che in merito ai fattori che determinano variazioni nelle frequenze alleliche è da considerare poi la cosiddetta deriva genetica, ovvero i cambiamenti randomici nelle frequenze alleliche di una popolazione per motivi casuali.

5.1.1 Il costo della resistenza

Le mutazioni conferenti resistenza tipicamente si verificano in geni responsabili di funzioni essenziali; quindi, mutazioni in questi siti sono generalmente nocive in assenza di antibiotico. Si pensa che gli effetti deleteri originino dal costo derivato dal mantenimento dei plasmidi conferenti resistenza o dagli effetti pleiotropici dati da mutazioni nei cromosomi. In quest'ultimo caso i costi spesso sono dovuti al fatto che le mutazioni di resistenza sono situate in geni responsabili di funzioni cellulari essenziali, come la trascrizione, la traduzione o la biogenesi della parete cellulare, che possono perdere di efficienza se alterate.

In generale, fino agli anni '80 del Novecento la teoria prevalente riguardo all'antibiotico-resistenza sosteneva che questa sarebbe rapidamente scomparsa in seguito alla riduzione o sospensione dell'uso dell'antibiotico in questione. Questa assunzione, come verrà trattato in seguito, si basava sull'ipotesi che, in assenza di una pressione selettiva ad opera dei farmaci antimicrobici, i ceppi resistenti sarebbero stati superati dagli analoghi ceppi suscettibili ma più *fit*, poiché i ceppi resistenti erano considerati essere gravati dall'effetto negativo delle mutazioni di resistenza: al termine del trattamento antibiotico questo

“costo della resistenza” superava il beneficio da essa data in presenza del farmaco. Studi seguenti hanno però dimostrato come la questione sia più complessa e che tipicamente i meccanismi di resistenza possono essere mantenuti mentre il costo sulla fitness viene diminuito tramite mutazioni successive, anche se con delle differenze tra scenari *in vivo* rispetto a *in vitro*.

Studi *in vitro* come quelli di MacLean (MacLean *et al.*, 2015) e Starikova (Starikova *et al.*, 2013) hanno determinato che generalmente l’acquisizione della resistenza comporta un costo per la fitness in assenza di antibiotici.

Gli studi di Starikova e dei suoi colleghi si sono concentrati sul costo in termini di fitness di vari elementi genetici mobili in colonie di *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. I ricercatori hanno misurato la variazione nella fitness determinata da diversi elementi genetici mobili, tra cui plasmidi conferenti resistenza alla vancomicina, quando i diversi ceppi batterici (resistenti e sensibili) erano messi in competizione in una coltura comune, in assenza di antibiotico. Dai risultati degli studi è emerso che i cambiamenti nella fitness causati dai diversi plasmidi variavano dall’essere altamente svantaggiosi all’essere neutrali o in alcuni pochi casi addirittura positivi. Ad esempio, alcuni plasmidi riducevano la fitness del 25%, altri del 14%.

Data la presenza di un costo per la fitness causato dalla resistenza, è logico pensare che i ceppi suscettibili nel tempo superino i ceppi resistenti. Questo è concorde con quanto osservato dagli studi di H. Seppälä (Seppälä *et al.*, 1997) e B. S. Gottesman (Gottesman *et al.*, 2009) in cui si è rilevata una diminuzione della resistenza in contesti clinici in cui si è sospeso l’uso di certi antibiotici. Dalle ricerche di Seppälä è emerso che, contestualmente alla diminuzione dell’uso dei macrolidi da 2.40 dosi giornaliere per 1000 abitanti finlandesi nel 1991 a 1.38 dosi nel 1992 e negli anni seguenti, si è verificata una stabile diminuzione nella frequenza di rilevazione di isolati eritromicino-resistenti di Streptococco di gruppo A. Questi sono passati da essere il 16.5% nel 1992 all’8.6% nel 1996, con una differenza statisticamente significativa. Anche gli studi di Gottesman, condotti circa un decennio più tardi, hanno rilevato risultati simili: alla diminuzione del consumo di fluorochinoloni è corrisposta una significativa diminuzione nella frequenza di isolamento di *E. coli* resistente (dal 12% al 9%).

Va sottolineato però che non sempre la presenza di geni o mutazioni di resistenza implica un costo per la fitness. Nei suoi studi P. Durão riporta molteplici esempi di questo: mutazioni determinanti resistenza a rifampicina e streptomicina possono conferire un vantaggio in termini di sopravvivenza in batteri fagocitati da macrofagi, mutazioni portanti resistenza ai carbapenemi possono determinare un aumento della fitness in casi di infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e mutazioni conferenti resistenza alla vancomicina

possono essere selezionate positivamente come risultato della competizione tra diversi genotipi di *Staphylococcus aureus* (Durão *et al.*, 2018).

Queste evidenze dimostrano come sia estremamente rilevante l'influenza delle condizioni ambientali e della situazione specifica nel determinare il costo della resistenza in termini di fitness.

5.2 Le mutazioni compensatorie

È da considerare che i batteri possono ridurre il costo della resistenza acquisendo mutazioni aggiuntive, dette mutazioni compensatorie, ulteriore argomento di studi di P. Durão e dei suoi collaboratori. Queste sono mutazioni che riducono l'impatto negativo sulla fitness causato dalle altre mutazioni. La rapida acquisizione di mutazioni compensatorie da parte di cloni resistenti è cruciale nell'impedire che essi vengano superati dai batteri sensibili a causa del costo della resistenza.

La compensazione può avvenire o perdendo la mutazione originale di resistenza, in un processo noto come reversione, o acquisendo ulteriori mutazioni che ne contrastano il costo, generalmente interessanti geni codificanti per proteine coinvolte in processi cellulari correlati a quelli oggetto della mutazione originale. Nello specifico, la reversione è un particolare tipo di compensazione in cui si verifica il ritorno alla sequenza genetica originale. Quando questo accade in presenza di antibiotici, il ceppo batterico generalmente muore a causa della forte pressione selettiva data dal farmaco, nocivo per i batteri non più capaci di impedirne l'azione, ma la reversione in assenza di antibiotico è clinicamente rilevante poiché i batteri sopravvivono e risultano essere nuovamente sensibili. In ogni caso, la reversione è molto più rara rispetto alla compensazione tramite acquisizione di mutazioni addizionali, dato che i target mutazionali di quest'ultima sono molto più numerosi. Infatti la reversione può avvenire solamente se si verifica la contro-mutazione specifica mentre le mutazioni portanti alla compensazione possono essere varie e molteplici.

Le dinamiche di comparsa degli adattamenti compensatori dipendono da vari fattori, tra cui il tasso di mutazione dei batteri e il costo della mutazione in termini di fitness. Considerando il caso più semplice, dato dalla presenza di una singola mutazione di resistenza, è stato dimostrato che la compensazione tipicamente è più rapida quando il costo per la fitness è più alto. Da questo fatto si può supporre che i cloni aventi mutazioni più deleterie in termini di fitness abbiano un maggiore potenziale adattativo. Su questo aspetto si sono concentrati gli studi di A. Couce (Couce *et al.*, 2015), che è giunto alla conclusione secondo cui i genotipi a bassa fitness si adattano più velocemente degli analoghi più *fit*, ovvero più adatti alle condizioni ambientali. Dalle sue ricerche è infatti

emersa una tendenza di dipendenza inversa tra adattabilità e fitness, secondo cui il tasso di cambiamento della fitness nel tempo, detto tasso di adattabilità, dipende dal livello di adattamento di un genotipo all'ambiente in quel momento. Diverse ipotesi sono state fatte per spiegare questo fenomeno, ad esempio che i genotipi meno adattati vanno incontro a maggiori cambiamenti nella fitness semplicemente perché hanno più mutazioni a loro disposizione a cui possono andare incontro per aumentare la fitness. Inoltre, queste mutazioni vantaggiose hanno un effetto relativo positivo maggiore sui genotipi meno adattati e quindi più sfavoriti. Questa relazione tra tasso di aumento della fitness e fitness iniziale è rappresentato dalla Figura 5.1, che considera sulle ascisse la fitness iniziale W e sulle ordinate il tasso di cambiamento di questa nelle generazioni. Questa tendenza è stata dimostrata non solo per i batteri, ma anche per lieviti come *S. cerevisiae* e virus batteriofagi e quindi risulta essere significativa per tutti gli studi sull'evoluzione degli organismi.

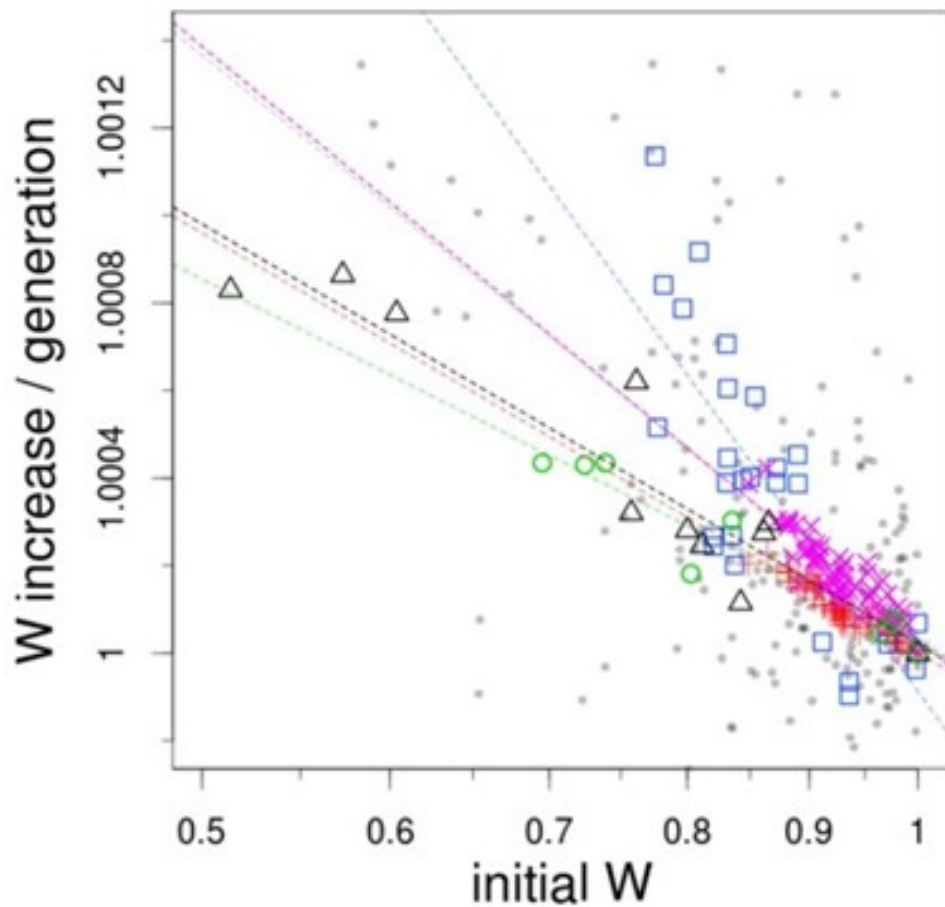


FIGURE 1 | Fitness increase as an inverse function of initial fitness. The datasets used here correspond to evolution experiments with *S. cerevisiae* (BY4741 strain, gray small circles; DBY15108 strain at 250 generations, magenta crosses; at 500 generations, red diagonal crosses), *E. coli* (mutator MG1655 strain, blue squares; wild-type REL606 strain, green circles) and microvirid bacteriophages (black triangles). Dashed lines shows best-fit log-log linear regression model to each dataset (correlation coefficients: gray, 0.33; magenta, 0.80; red, 0.87; blue, 0.67; green, 0.92; black, 0.87; *F*-test, all $P < 10^{-15}$). Note that both axes are on a natural logarithmic scale.

Figura 5.1: Relazione tra fitness iniziale e aumento della fitness, tratta da Couce *et al.*, (2015).

5.2.1 Evidenze sperimentali sulla mitigazione del costo delle mutazioni di resistenza

Durante i suoi studi Starikova (Starikova *et al.*, 2013) si è dedicata anche ad indagare se il costo in termini di fitness di un plasmide si riducesse nel corso dell'evoluzione della specie batterica. Tramite esperimenti di competizione tra una popolazione di *E. faecium* reso vancomicina-resistente grazie ad un plasmide (vanA) e la popolazione originale Starikova ha dimostrato che il costo iniziale del plasmide può rapidamente diminuire grazie all'emergenza di mutazioni di compensazione, che si verificano durante l'evoluzione della popolazione batterica. Il possibile mantenimento del plasmide di resistenza anche in assenza di antibiotico, non rappresentante un costo per la fitness grazie alle mutazioni compensatorie, è rilevante poiché dimostra come la riduzione dell'utilizzo della vancomicina potrebbe non portare a una diminuzione dei livelli di resistenza.

5.2.2 Implicazioni riguardanti la corretta durata di un trattamento antibiotico

Il ruolo della presenza degli antibiotici nell'emergenza di mutazioni di compensazione è particolarmente rilevante se si considera l'attuale dibattito il merito a quale sia la durata appropriata di un trattamento antibiotico. Per alcuni tipi di infezione sono disponibili forti evidenze in merito a quale sia la durata ottimale del trattamento, ma per molte altre sono presenti solo considerazioni empiriche. È chiaro che l'uso degli antibiotici favorisce la selezione positiva di mutanti resistenti, facilitando la loro replicazione. Nel caso di trattamenti di lunga durata la sottopopolazione di mutanti resistenti è in grado di raggiungere elevate dimensioni, permettendo nel tempo la comparsa di mutazioni di compensazione e determinando quindi una fitness ancora maggiore di quella data dalla presenza della semplice mutazione di resistenza. Se la durata del trattamento è sufficiente, ci sarà una competizione tale tra i ceppi resistenti da selezionare quelli aventi anche le mutazioni di compensazione, favoriti rispetto ai mutanti con la sola mutazione di resistenza, dato che questa ha il suo costo in termini di fitness. La comparsa di fenomeni di compensazione è rilevante perché è l'effetto delle mutazioni compensatorie sulla fitness misurata in un ambiente privo di antibiotici che determinerà se i ceppi batterici resistenti si affermeranno o verranno superati dai ceppi senza mutazioni, una volta sospeso il trattamento.

Nel caso invece di trattamenti di breve durata è improbabile che i mutanti resistenti diventino maggioritari ed è più difficile la comparsa di fenomeni di compensazione durante il trattamento, anche se comunque dipende dal caso specifico.

In entrambi gli scenari, una volta terminato il trattamento antibiotico i ceppi resistenti avranno, rispetto ai ceppi sensibili, il peso delle mutazioni di resistenza e per questo in ogni caso (sia post trattamenti di breve durata che post trattamenti di lunga durata) si affermeranno mutazioni di compensazione, proprio perché se il costo è contro-bilanciato dalla compensazione la fitness è maggiore e la popolazione batterica portante sia i geni di resistenza sia le mutazioni di compensazione cresce. La differenza tra i trattamenti di breve e di lunga durata sta nel fatto che nei primi le mutazioni compensatorie emergono tipicamente alla fine del trattamento, quindi in assenza di antibiotico, mentre nel secondo caso esse si affermano già durante il trattamento. Questo accade per un fattore temporale, dato che in un trattamento di qualche giorno potrebbe non esserci il tempo per la comparsa di mutazioni compensatorie, che però saranno comunque favorite al termine di questo, quando i ceppi resistenti si troveranno a competere tra loro o con gli eventuali ceppi sensibili rimasti. Si tratta quindi di due scenari diversi, favorenti rispettivamente mutazioni compensatorie differenti, essendo che i fattori determinanti la pressione selettiva del contesto non sono gli stessi. Per questo va considerato che nei due casi le mutazioni compensatorie favorite potrebbero non essere uguali e che a seconda della durata del trattamento antibiotico si avranno sottopopolazioni batteriche diverse geneticamente, ovvero con mutazioni di compensazione differenti. Queste influenzeranno la fitness dei ceppi resistenti nella competizione con i ceppi sensibili e tra loro. Appare chiaro quindi come la determinazione della durata ottimale di un trattamento antibiotico debba tenere conto anche di questi aspetti, perlomeno negli studi *in vitro* dove è più facile l'analisi di queste variabili. È evidente poi come le mutazioni compensatorie abbiano un peso rilevante nel determinare la traiettoria evolutiva di un patogeno e pertanto costituiscano un fenomeno da sottoporre ad ulteriore approfondimento.

5.3 Traiettorie evolutive e modelli

Per quanto riguarda la cosiddetta traiettoria evolutiva di un microrganismo e delle sue capacità di resistenza, sono rilevanti gli studi di D. Hughes e dei suoi collaboratori (Hughes *et al.*, 2017). Essi hanno realizzato una *review* narrativa, pubblicata sulla prestigiosa rivista *Annual Review of Microbiology*, mirata a sintetizzare e integrare le conoscenze esistenti sulle traiettorie evolutive che portano allo sviluppo della resistenza agli antibiotici nei batteri. L'elevato impatto di questo articolo è dimostrato inoltre dal numero elevato di citazioni raggiunte, superiore a 300 attualmente.

Durante i loro studi, questi ricercatori si sono concentrati su quali siano i fattori in grado di predire la traiettoria evolutiva di un microrganismo, cioè in che direzione esso

evolve e quali caratteristiche acquisisce e consolida. Questi fattori sono risultati essere il tasso di mutazione, il livello di resistenza conferito dal meccanismo di resistenza, la fitness del mutante resistente in relazione alla concentrazione di antibiotico e l'entità della pressione selettiva.

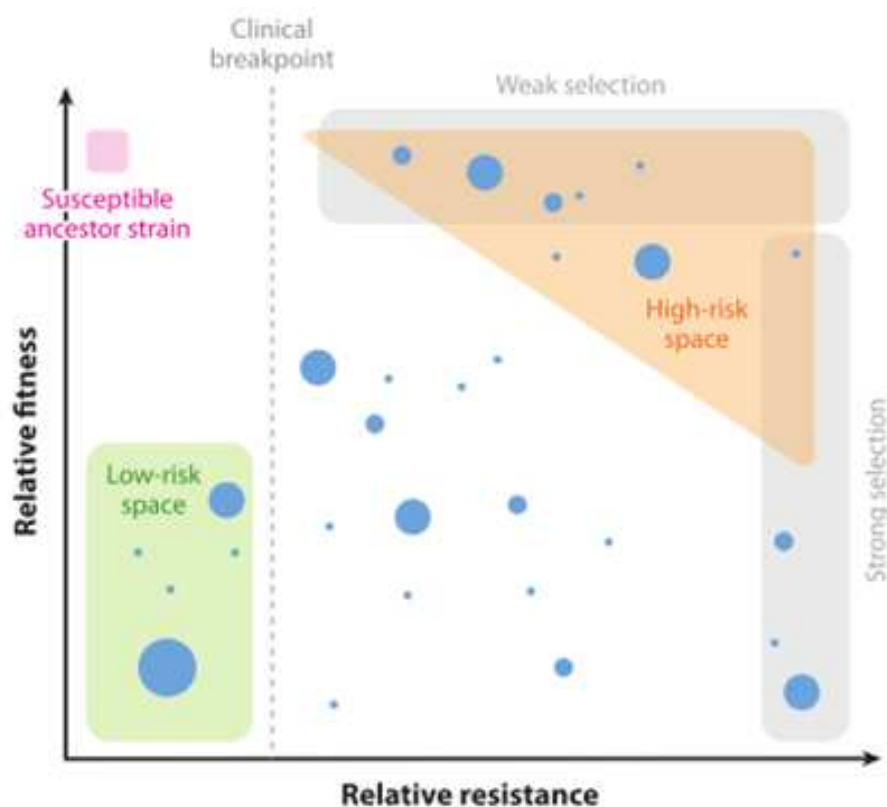


Figura 5.2: Relazione tra fitness e resistenza, tratta da Hughes *et al.* (2017).

Come si vede dalla Figura 5.2, l'illustrazione grafica dell'evoluzione della resistenza ha come oggetto il cosiddetto spazio mutazionale, ovvero l'insieme di tutti i tipi di mutazioni o eventi di trasferimento genico orizzontale che possono generare resistenza ad un antibiotico, considerando le loro caratteristiche in termini di probabilità di apparizione (cerchi più grandi o più piccoli), il livello di resistenza conferito e la fitness in funzione della pressione selettiva. Lo spazio "ad alto rischio" rappresenta le mutazioni di resistenza che è più probabile che si affermino, mentre quelle dello spazio "a basso rischio" sono meno favorite ad esempio perché la fitness conferita è minore. I ricercatori sottolineano come la conoscenza dello spazio mutazionale sia fondamentale per predire quali mutanti è più probabile che emergano e si diffondano, ma al momento le conoscenze in merito

sono estremamente limitate, anche per la difficoltà di determinare i quattro parametri necessari per la predizione della traiettoria evolutiva.

Conclusioni riguardanti l'impatto della resistenza sulla fitness

Dalle evidenze precedentemente riportate emerge come, nello studio dell'antibiotico-resistenza, più importante rispetto al fatto che la resistenza emerga o meno risulta essere l'impatto di questa sulla fitness e la possibilità che si sviluppino mutazioni compensatorie. In questo contesto vanno comunque considerati dei casi particolari, come la resistenza conferita dalle pompe di efflusso. I geni responsabili, come *tetR/tetA*, *ampR/ampC* e altri, sono spesso sotto stretto controllo genetico, quindi la loro espressione disregolata può essere deleteria per la cellula, diminuendo la fitness in assenza di antibiotico. Altri geni di resistenza, come quelli per la resistenza agli aminoglicosidi, sono espressi costitutivamente ma la loro espressione può ridurre la fitness (Wright, 2007). I geni su plasmidi, localizzati su elementi genetici mobili assieme ad altri geni di resistenza, possono invece essere mantenuti tramite la co-selezione anche in assenza di specifica pressione selettiva. Con co-selezione si intende il processo mediante il quale l'esposizione ad un agente antimicrobico porta a selezionare la resistenza verso molteplici agenti, come metalli, antibiotici o biocidi, perché i diversi geni di resistenza sono correlati (*linked*), ad esempio perché situati sullo stesso plasmide. Questo può essere ottenuto anche tramite la cross-resistenza, quando uno stesso meccanismo fornisce resistenza verso più agenti, come accade nel caso delle pompe di efflusso, o tramite la co-regolazione, in cui risposte trascrizionali sono correlate tra loro e producono effetti coordinati, inducendo l'espressione di più geni. Tutti questi fenomeni sono stati riconosciuti come meccanismi chiave implicati nell'antibiotico-resistenza (Murray *et al.*, 2024).

5.4 Differenze *in vitro* versus *in vivo*

Un'osservazione interessante in merito al tema delle mutazioni compensatorie è stata formulata da R. C. MacLean (MacLean *et al.*, 2015), in particolare riguardo alla differenza di risultati tra gli studi *in vitro* e quelli *in vivo*. Tipicamente infatti gli studi sperimentali dimostrano il mantenimento dei geni di resistenza anche in assenza di antibiotici, grazie all'evoluzione compensativa, mentre negli studi clinici generalmente la resistenza diminuisce, suggerendo che l'adattamento compensativo non è efficace in vivo. Una meta-analisi (Bell *et al.*, 2014) basata su più di 100 studi riguardanti l'associazione spaziale e temporale tra antibiotico-resistenza e consumo di antibiotici ha evidenziato

infatti la presenza di una forte associazione tra consumo e resistenza. Se l'adattamento compensatorio fosse comune, la resistenza dovrebbe essere maggiormente svincolata dai livelli di consumo (bassi livelli di consumo dovrebbero essere comunque associati a moderati o alti livelli di resistenza) mentre la forte associazione che esiste tra consumo e resistenza suggerisce che gli adattamenti compensatori sono rari in scenari clinici.

Nei suoi studi MacLean argomenta le motivazioni alla base di questa differenza di risultati, dovuta principalmente alla mancata capacità degli studi sperimentali di individuare i limiti degli adattamenti compensativi in scenari clinici reali.

La differenza tra scenario sperimentale e clinico sta innanzitutto nel fatto che in un'infezione *in vivo* il trattamento antibiotico può non eradicare completamente i ceppi sensibili, e quindi si può instaurare una competizione tra ceppi sensibili e resistenti che porta alla scomparsa di quelli resistenti una volta sospeso il trattamento. Inoltre, secondo MacLean, gli studi di laboratorio sovrastimano l'efficacia degli adattamenti compensatori in natura, non considerando i costi comunque associati alle mutazioni compensatorie.

5.4.1 Sopravvivenza dei ceppi sensibili al trattamento

Per quanto riguarda il primo punto portato da MacLean, si evidenzia come gli studi sperimentali partano appunto dall'ipotesi che il trattamento antibiotico elimini tutte le cellule sensibili. In natura questo è però difficile, dato che l'esposizione al farmaco è diversa all'interno dei differenti tessuti del singolo paziente e questa eterogeneità può generare "santuari" contenenti dosi relativamente basse di antibiotico. Inoltre, anche tra cellule dello stesso ceppo sensibile, esiste una certa eterogeneità nella sensibilità all'antibiotico stesso, data anche dallo stato metabolico della cellula. Infatti una cellula metabolicamente dormiente può risultare meno suscettibile all'azione nociva del farmaco. Per questi motivi si può affermare che, in una popolazione batterica in natura, una piccola percentuale di cellule deficitaria dei geni di resistenza può comunque sopravvivere al trattamento. Essendo che la resistenza, come detto precedentemente e come rappresentato dalla 5.3, ha un suo costo e che una frazione di cellule sensibili tipicamente sopravvive all'antibiotico, la resistenza persisterà nella popolazione solo se i mutanti resistenti saranno in grado di superare il costo della resistenza prima di essere soverchiati dal ceppo sensibile, non gravato dal costo della resistenza in termini di fitness. La Figura 5.3 è ottenuta considerando diversi studi che hanno comparato la fitness di isolati resistenti e sensibili compresenti, in assenza di antibiotico. Con fitness uguale a 1 si intende che le due popolazioni hanno uguali abilità competitive, mentre i numeri tra le parentesi tonde rappresentano il numero di isolati resistenti esaminati in ogni studio. Come si vede, la

fitness degli isolati resistenti è generalmente minore, pertanto in assenza di antibiotico questi sono destinati ad essere superati dai ceppi sensibili, a meno che non emergano mutazioni compensatorie valide.

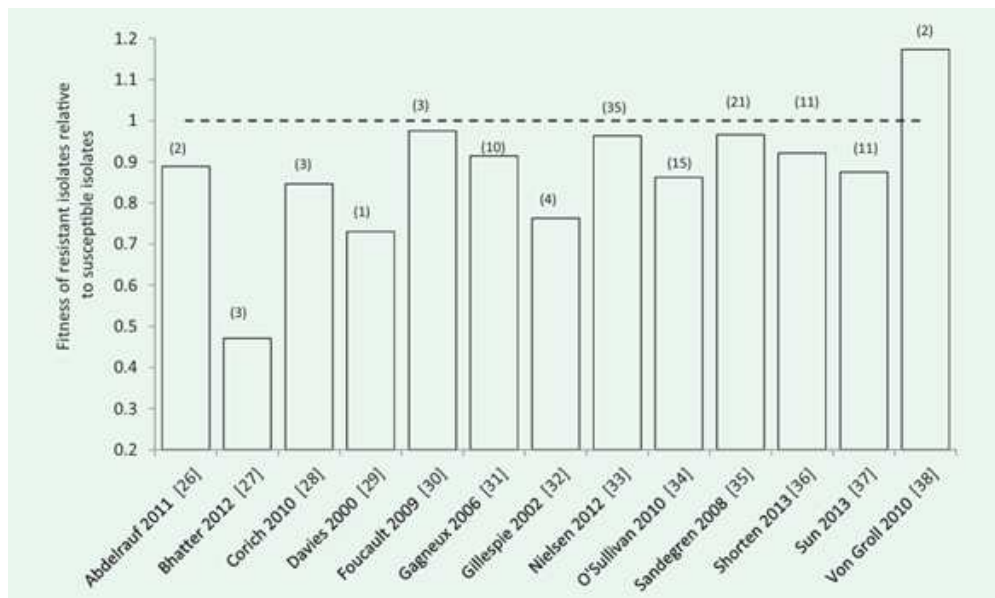


Figura 5.3: Fitness dei ceppi resistenti rispetto a quelli sensibili, in assenza di antibiotico secondo diversi studi, tratta da MacLean *et al.* (2015).

Un'importante eccezione a questa argomentazione è data dal fatto che, nei pazienti affetti da infezioni croniche e quindi sottoposti a lunghi trattamenti antibiotici, la sopravvivenza dei ceppi sensibili è improbabile. Data l'elevata durata dei trattamenti questi ceppi vengono verosimilmente eradicati e ciò può spiegare come alcune delle più solide evidenze a favore degli adattamenti compensatori derivino da studi di patogeni come il *M. tuberculosis*, responsabile di infezioni di lunga durata trattate con cicli di antibiotici di svariati mesi (Comas *et al.*, 2012).

5.4.2 Le mutazioni compensatorie: una soluzione imperfetta

Un'altra argomentazione fornita da MacLean sottolinea come dagli studi emerga che le mutazioni compensatorie spesso non permettono un recupero completo del costo associato alla resistenza. Questo è dovuto al fatto che queste mutazioni hanno dei costi propri, dato che sono situate in geni essenziali. Infatti generalmente risultano poco favorevoli in assenza delle mutazioni di resistenza associate. Questo aspetto non è particolarmente rilevante negli studi di laboratorio, dato che i ceppi aventi le mutazioni compensatorie

comunque risultano avere, in questo setting, un vantaggio in termini di fitness rispetto ai loro competitor resistenti, ma questo è meno evidente in uno scenario clinico. Dagli studi emerge come le mutazioni compensatorie determinino un maggiore aumento della fitness *in vitro* rispetto agli scenari *in vivo*, probabilmente perché il modo in cui gli studi in laboratorio sono organizzati favorisce accidentalmente questo aspetto. Infatti MacLean sottolinea come gli studi sperimentali di fatto proteggano i cloni resistenti portatori di mutazioni compensatorie, impedendo loro di competere con i cloni sensibili, più facilmente eradicati in uno scenario di laboratorio.

In conclusione, gli studi recenti mostrano come la compensazione non sia così efficace in uno scenario clinico, e questo spiega come mai la resistenza venga persa più frequentemente e velocemente in natura rispetto a quanto accade negli studi sperimentali. Appare quindi chiaro come, nello studiare questo fenomeno, vada considerata questa differenza presente nei risultati dei diversi studi. Va infatti tenuto a mente che lo scenario reale, costituito dai pazienti aventi un'infezione resistente, può essere diverso da quello di laboratorio. Questo è importante anche per la determinazione delle linee guida da seguire dal punto di vista nazionale e sovranazionale, poiché è fondamentale capire se è più vantaggioso concentrarsi sulla riduzione dell'uso degli antibiotici al fine di eradicare le resistenze oppure esplorare altre strategie. Essendo che una delle maggiori minacce per una popolazione di batteri resistenti sembra essere rappresentata dalle loro controparti sensibili, aventi maggiore fitness, questo potrebbe essere poi un ulteriore interessante punto di partenza nella formulazione di strategie contro l'antibiotico-resistenza, basate ad esempio sulla soppressione della popolazione resistente da parte degli analoghi sensibili, come ipotizzato già anche in uno studio di Levy e Marshall (Levy *et al.*, 2004).

5.5 Ruolo evolutivo del trasferimento genico orizzontale

È evidente come il trasferimento di alleli o l'introduzione di nuovi geni siano processi vantaggiosi dal punto di vista evolutivo, perché permettono di aumentare la diversità genica della popolazione e di esprimere proteine, sviluppare strutture o essere in grado di compiere processi favorevoli alla sopravvivenza anche qualora le condizioni ambientali dovessero variare. La potenziale variabilità genetica è infatti vantaggiosa in un contesto di eventuale cambiamento ambientale esterno. A prova di ciò uno studio (Arnold *et al.*, 2020) ha infatti dimostrato come in *N. gonorrhoeae* i geni che hanno una maggiore variabilità allelica e sono caratterizzati da selezione positiva mostrano anche forti evidenze di ricombinazione, favorente la variabilità. Si ricorda infatti che con ricombinazione genica, trattata nel Capitolo 4, si intende il processo biologico di scambio di materiale

genetico tra molecole di DNA, che genera nuove combinazioni alleliche e aumenta la variabilità genetica.

Inoltre è stato dimostrato anche che gli hotspot dove più spesso avviene la ricombinazione non sono equamente distribuiti tra le diverse categorie di funzioni geniche ma tipicamente si riscontrano in geni che codificano per proteine di superficie (come le porine) che sono responsabili dell'interazione con l'ambiente (Arnold *et al.*, 2022). Lo stesso studio mostra come la ricombinazione genica, oltre a generare nuovi alleli la cui distribuzione è poi influenzata dalla selezione, condiziona anche i pattern di diversità all'interno del genoma. Si consideri il rapporto tra il tasso di ricombinazione r (quanto un gene è sottoposto a ricombinazione) e il coefficiente di selezione s (quanto un tratto si mantiene venendo selezionato positivamente) di una mutazione, ovvero il valore r/s . Questo rapporto determina l'impatto che la selezione positiva ha sulla diversità del genoma: se una mutazione molto vantaggiosa insorge e la selezione è molto maggiore rispetto al tasso di ricombinazione, ovvero $r/s \ll 1$, la selezione procede così rapidamente che tutte le variazioni associate a questo allele vantaggioso si diffondono anch'esse, riducendo la diversità complessiva dei genomi della popolazione. Questo perché geni che si trovano fisicamente vicini sullo stesso cromosoma, detti geni *linked*, ovvero "associati" o "concatenati", tendono ad essere trasmessi insieme alla progenie durante la divisione cellulare. Se invece il tasso di ricombinazione è molto alto ($r/s \gg 1$) mentre la mutazione vantaggiosa si diffonde avverranno anche episodi di ricombinazione, separando l'allele vantaggioso dal resto del genoma. Questo tipo di meccanismo crea il cosiddetto *gene - specific sweep*, la riduzione in diversità ristretta a un gene specifico. Si ha quindi una riduzione del livello di polimorfismo genetico osservato in una regione del genoma, perché è presente un locus sotto selezione naturale positiva che aumenta di frequenza rispetto agli altri, mentre i geni vicini non sono interessati dal processo di selezione perché neutrali. In questo modo unicamente l'allele vantaggioso risulta essere sempre più diffuso all'interno della popolazione.

Uno studio (Engelstädter *et al.*, 2014) ha indagato nel dettaglio il vantaggio evolutivo dei processi di trasferimento genico orizzontale e in particolare della trasformazione, che si basa sull'acquisizione di materiale genetico dall'ambiente (trattata nel Capitolo 4). I ricercatori hanno ipotizzato un processo da loro denominato "viaggio nel tempo genetico", secondo il quale il vantaggio del trasferimento genico orizzontale mediante trasformazione consiste nel recuperare dall'ambiente vecchi geni, dando la possibilità ai batteri di tornare a uno stato genotipico passato che può rivelarsi favorevole nell'ambiente attuale o futuro. In particolare, la differenza tra la trasformazione e le altre forme di trasferimento genico orizzontale consiste nel fatto che nella trasformazione il DNA è importato dall'ambiente

esterno e non è scambiato tra individui viventi come invece accade mediante gli altri meccanismi. Essendo che le molecole di DNA possono essere abbastanza stabili nell'ambiente e nel tempo, qualora vi siano le condizioni adeguate, si può creare una situazione in cui il pool di DNA presente nell'ambiente è diverso in composizione rispetto a quello presente nella popolazione di cellule. Nel caso in cui una mutazione sia svantaggiosa in un certo momento o ambiente questo determinerà la morte dei batteri aventi quella mutazione e di conseguenza produrrà nell'ambiente un'abbondanza di sequenze di DNA contenenti la mutazione. In queste circostanze la trasformazione e l'acquisizione di queste sequenze sarebbe svantaggiosa, ma qualora le condizioni cambiassero l'acquisizione di quel DNA libero preservato nel medium attorno ai batteri potrebbe essere invece positiva dal punto di vista della sopravvivenza. Nel corso dello studio i ricercatori hanno confrontato due tipi di batteri, un gruppo capace di attuare la trasformazione e l'altro no. Dalle analisi è emerso il ruolo positivo della trasformazione per quanto riguarda la sopravvivenza in un ambiente le cui condizioni variano nel tempo, proprio perché questo processo permette ai batteri di adattarsi in modo più veloce ai cambiamenti esterni, traendo vantaggio dai geni conservati nel pool di DNA ambientale. Tramite questi esempi si deduce quindi come i processi di trasferimento genico orizzontale abbiano un grande ruolo nella genesi e nel mantenimento delle resistenze e si vuole sottolineare l'importanza del tenerli in considerazione nelle iniziative di gestione dell'antibiotico-resistenza.

Capitolo 6

Discussione. Approcci innovativi e soluzioni alternative al fenomeno dell'antibiotico-resistenza

L'antibiotico-resistenza è un fenomeno la cui gravità e le cui implicazioni cliniche si stanno facendo sempre più rilevanti nel tempo, e il sistema attuale di sviluppo e produzione di nuovi antibiotici non si sta dimostrando capace di fronteggiare efficacemente questa emergenza sanitaria. È pertanto fondamentale esplorare nuove strategie che permettano di uscire da, o quantomeno rallentare, il circolo vizioso per cui alla produzione di un nuovo antibiotico segue l'emergenza della resistenza e la conseguente inefficacia dell'antibiotico. Questi approcci sono molteplici, molto vari e promettenti, ma potranno dimostrare il loro potenziale solo se integrati tra loro e adottati nel contesto di strategie non solo nazionali ma sovranazionali, una volta riconosciuta l'importanza della ricerca e del finanziamento degli studi in questo ambito.

6.1 Approccio *One Health*

Con approccio *One Health* si intende una strategia che mira a bilanciare e ottimizzare in modo sostenibile la salute umana, animale e ambientale (World Health Organization, 2014). L'antibiotico-resistenza e l'antimicrobico-resistenza in generale sono collegate a ciascuna di queste realtà dall'eccessivo uso di farmaci antimicrobici in vari settori, tra cui l'agricoltura, l'allevamento e la medicina umana. La cattiva gestione degli antibiotici, il controllo inadeguato delle infezioni, le contaminazioni ambientali e la migrazione di animali e persone portatori di batteri resistenti facilita la diffusione del fenomeno

(Velazquez-Meza *et al.*, 2022). L'approccio *One Health* è stato per la prima volta ipotizzato nel Diciannovesimo secolo, quando Rudolf Virchow introdusse il termine zoonosi, indicando una prima idea di relazione tra salute animale e umana. Successivamente Calvin Schwabe introdusse il concetto di medicina unica, riaffermando la stretta relazione tra medicina umana e animale. Nel 2004 vennero poi stabiliti i "Principi di Manhattan" (Wildlife Conservation Society, 2004 - Allegato 1), al fine di combattere le malattie infettive e mantenere l'equilibrio tra gli ecosistemi (Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

L'approccio *One Health* risulta essere di estrema rilevanza attualmente anche perché negli ultimi decenni si è assistito a una graduale espansione dei territori controllati dall'uomo in aree dove prima sorgevano foreste o ambienti naturali, soprattutto in zone come l'Africa centrale o il Sud America. Questa espansione dell'urbanizzazione porta l'uomo ad essere in contatto con ambienti prima inaccessibili, possibili serbatoi di patogeni ancora sconosciuti. I contatti fra specie umana e specie animali selvatiche devono pertanto essere considerati con cautela, in quanto possibili generatori di trasmissione di patologie, e in questo contesto l'approccio *One Health*, improntato anche sulla preservazione degli ecosistemi selvatici, risulta essere fondamentale.

6.1.1 Uso degli antimicrobici in umani, animali e piante

Gli antimicrobici hanno svariati usi nell'allevamento e nell'acquacoltura e rivestono un importante ruolo nella produzione animale, essendo usati per vari scopi (profilattici, terapeutici e per favorire lo sviluppo e la crescita). Si stima che nel mondo il volume di antimicrobici usati negli animali sia maggiore di quelli usati per il consumo umano (Velazquez-Meza *et al.*, 2022). La maggior parte degli antibiotici usati negli umani è prescritta anche negli animali e alcuni, come le tetracicline o la streptomina, anche nelle piante. L'antibiotico-resistenza può essere facilmente trasferita tra ecosistemi e popolazioni diverse dato che i batteri resistenti possono essere rilasciati nel suolo e da qui possono infettare nuovamente piante e altri elementi dell'ambiente. I residui degli antimicrobici possono rimanere negli ambienti acquatici per lungo tempo e diffondersi, esercitando una pressione selettiva significativa in ampie aree. Esistono numerosi studi che provano come l'uso indiscriminato di antimicrobici in campo veterinario abbia portato all'emergenza di batteri resistenti capaci di infettare anche gli umani, come *Enterococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* e ceppi di *E. coli* (Dutil *et al.*, 2010; Velazquez-Meza *et al.*, 2022).

6.1.2 L'approccio *One Health* per contrastare l'antimicrobico-resistenza

Nel suo studio Velazquez-Meza, basandosi anche su le evidenze raccolte da O'Neill (O'Neill, 2016) riassume le strategie chiave per contenere l'antimicrobico-resistenza (AMR) secondo l'approccio *One Health*:

1. Condurre una campagna globale di sensibilizzazione pubblica per educare la società sui danni causati dall'uso eccessivo e improprio degli antimicrobici. L'attuazione di campagne pubbliche efficaci può ridurre il numero di antimicrobici prescritti.
2. Migliorare e rafforzare le misure igieniche e prevenire la diffusione delle infezioni. Migliorando i sistemi sanitari e le condizioni di vita si può ridurre significativamente la domanda di antimicrobici e quindi diminuire il rischio di comparsa di nuovi ceppi resistenti.
3. Ridurre l'uso non necessario di antimicrobici in agricoltura e la loro dispersione nell'ambiente. A livello globale, le maggiori quantità di antimicrobici vengono consumate nell'agricoltura e nell'acquacoltura. L'uso degli antimicrobici come profilassi e come promotori della crescita dovrebbe essere considerato pericoloso e non necessario. Inoltre, è stato documentato che gli animali espellono una percentuale significativa (75%–90%) degli antimicrobici senza metabolizzarli, disperdendoli quindi nell'ambiente.
4. Migliorare la sorveglianza globale della resistenza ai farmaci. La comunità medica e scientifica necessita di una chiara comprensione dei dati attuali e storici sull'AMR per chiarire i nuovi meccanismi di acquisizione della resistenza, conoscere con precisione i casi attuali e prevedere le minacce future. Per farlo è necessario comprendere meglio tre aspetti: il consumo di antibiotici nell'uomo e negli animali, gli attuali tassi di resistenza antibiotica e le basi molecolari dell'AMR.
5. Promuovere diagnosi cliniche innovative e rapide. Le diagnosi errate effettuate negli ospedali pubblici o privati portano a prescrizioni inutili di antibiotici. Lo sviluppo di test diagnostici rapidi e accurati consentirà ai clinici di somministrare antimicrobici ai pazienti che ne hanno realmente bisogno.
6. Promuovere lo sviluppo e l'uso di vaccini e di alternative agli antimicrobici. Lo sviluppo di vaccini contro batteri antibiotico-resistenti responsabili di infezioni gravi ridurrà il numero di pazienti infetti che necessitano di trattamento antimicrobico. Sono inoltre necessari maggiori 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 professionisti che lavorano nel campo delle malattie infettive. Affrontare l'AMR richiede professionisti qualificati come microbiologi, farmacisti, specialisti in malattie infettive, infermieri, specialisti nel controllo delle infezioni, veterinari ed epidemiologi. Per questo, i Paesi devono investire nella formazione di queste risorse umane.
8. Creare un fondo globale per l'innovazione nella ricerca iniziale di nuovi trattamenti. Sono necessari maggiori investimenti pubblici e privati nella ricerca e scoperta di nuovi farmaci per sviluppare nuove terapie. È necessario un fondo globale per sostenere ricerche che non risultano commercialmente attrattive.
9. Creare incentivi migliori per promuovere gli investimenti in nuovi farmaci e nel miglioramento di quelli esistenti. Lo sviluppo di nuovi antimicrobici è poco attrattivo per le aziende farmaceutiche poiché sul mercato esistono ancora antimicrobici relativamente efficaci. Inoltre, è difficile prevedere esattamente come e quando si svilupperà l'AMR, creando incertezza nelle decisioni economiche delle aziende farmaceutiche.
10. Costruire una coalizione globale per azioni concrete contro l'AMR. Un'azione globale è essenziale per ottenere progressi significativi nella lotta contro l'AMR. Inserire l'AMR nell'agenda politica internazionale e affrontarla attraverso l'approccio *One Health* è fondamentale per promuovere un reale cambiamento.

6.2 *Antimicrobial stewardship*

L'*antimicrobial stewardship* consiste in un approccio sistematico volto ad educare e sostenere i professionisti sanitari nel seguire linee guida basate sulle evidenze riguardo alla prescrizione e somministrazioni di farmaci antimicrobici. Si fa riferimento quindi ad una serie di interventi coordinati, che hanno lo scopo di promuovere l'uso appropriato degli antimicrobici e che indirizzano nella scelta ottimale del farmaco, della dose, della durata, della terapia e della via di somministrazione. (Società Italiana di Farmacia Ospedaliera e dei Servizi Farmaceutici delle Aziende Sanitarie, 2017).

Nel 2022 l'Organizzazione Mondiale della Sanità, proprio al fine di ridurre l'uso inappropriato degli antibiotici e favorire invece l'accesso adeguato ai trattamenti, ha sviluppato per questi farmaci la classificazione AWaRe (*Access, Watch, Reserve*). Questa fornisce

una guida pratica e basata sulle evidenze riguardo alla scelta dell'antibiotico, la dose, il modo di somministrazione e la durata del trattamento per 30 delle più comuni infezioni di bambini e adulti in comunità o in ambiente ospedaliero. Essa è accessibile al link <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062382>.

6.3 Antimicrobici non convenzionali

Al fine di trovare una soluzione al problema dell'antimicrobico-resistenza, sono stati pensati e testati numerosi composti e strategie a cui ci si riferisce con il termine di “antimicrobici non convenzionali”. La formulazione di nuovi antibiotici è infatti difficoltosa e si è dimostrata incapace di tenere il passo con l'evoluzione delle resistenze, pertanto è necessario indagare nuove strategie terapeutiche.

Tra queste si trovano gli anticorpi antibatterici, lo sviluppo di nuovi vaccini, i peptidi antimicrobici, gli oligonucleotidi antisense, i batteriofagi e il microbiota. In questa trattazione ci si concentrerà in particolare su queste ultime tre strategie.

6.3.1 Oligonucleotidi antisense

Questo tipo di approccio terapeutico sfrutta oligomeri di acidi nucleici a catena singola per legarsi a sequenza di mRNA complementari, inibendone la traduzione e promuovendone la degradazione (MacNair *et al.*, 2024). Questi oligonucleotidi antisense hanno però il limite dell'instabilità, della rapida degradazione e del basso *uptake* da parte delle cellule. Tramite combinazioni della struttura chimica si è però raggiunta una maggiore stabilità e un'aumentata capacità di entrata delle cellule, e questi oligonucleotidi sono stati approvati per il trattamento di alcune patologie diverse dalle infezioni, come la distrofia muscolare di Duchenne e l'ipercolesterolemia (Cirak *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015). La maggiore facilità di utilizzo di queste molecole nei procarioti sta nel fatto che in questi organismi il DNA batterico non è protetto da una membrana nucleare e che la trascrizione e la traduzione avvengono nel citoplasma, facilitando l'uso di nucleotidi esogeni per interferire con questi processi. Un limite di questa strategia è però dato dall'insufficiente capacità di queste molecole di penetrare nella cellula, in particolare nei batteri Gram-negativi (MacNair *et al.*, 2024). Al fine di superare questo ostacolo si è ipotizzato di accoppiare gli oligonucleotidi antisense con peptidi capaci di penetrare la membrana cellulare, facilitando il passaggio del composto, ma le tecniche sono ancora in via di sviluppo.

Lo scopo di questi oligonucleotidi è interferire con i processi cellulari, ma altre strategie sempre basate sugli oligonucleotidi hanno obiettivi anche più ambiziosi. Un esempio è quello riportato da P. Durão nella sua pubblicazione, già citata in precedenza (Durão *et al.*, 2018), in cui si menzionano gli studi di D. H. Ayhan e dei suoi collaboratori (Ayhan *et al.*, 2016). Questi hanno avuto come oggetto l'elaborazione di una strategia per convertire ceppi di batteri resistenti in ceppi più sensibili ad un dato antibiotico. Tramite l'uso di un oligonucleotide specificatamente progettato per agire come mRNA antisense inibitore della traduzione, diretto verso i geni di resistenza, i ricercatori sono riusciti a rendere nuovamente sensibili batteri la cui resistenza dipendeva dall'espressione di specifiche pompe di efflusso. La strategia è ancora in via di perfezionamento ma l'uso di oligonucleotidi antisense rappresenta un approccio innovativo e alternativo al tema delle resistenze, che pertanto andrebbe indagato e approfondito ulteriormente.

6.3.2 Batteriofagi

Un'altra strategia per le terapie antibatteriche consiste nell'uso di virus batteriofagi litici, detti anche fagi, che infettano la cellula batterica e che alla fine del ciclo produttivo rilasciano la progenie provocando la lisi della cellula. Questo è il meccanismo principale di funzionamento di questo approccio, ma i fagi possono anche interferire con i biofilm (Coyne *et al.*, 2022), aumentare la capacità di penetrazione dell'antibiotico, oppure rilasciare endolisine, in grado di distruggere la parete cellulare batterica.

Una panoramica sull'utilizzo dei fagi come trattamento antimicrobico è stata fornita da M. Kutateladze (Kutateladze *et al.*, 2010). I batteriofagi sono virus batterici presenti in tutti gli ambienti e dotati di attività molto selettiva, dato che attaccano solo le cellule batteriche per cui sono specifici. La capacità di attaccare e distruggere solamente un batterio specifico, unita alla loro possibilità di replicare esponenzialmente, li rende una potenziale alternativa molto valida agli antibiotici nel trattamento delle malattie infettive. Per quanto riguarda il confronto con gli antibiotici, i fagi hanno numerosi vantaggi rispetto a questi: non danneggiano altri organismi oltre ai loro target, la loro preparazione è rapida e le reazioni avverse fino ad ora sono state rare, anche considerando le preparazioni costituite da molteplici fagi, i cosiddetti *cocktails*. Inoltre, grazie alla capacità di replicare solo in presenza della cellula batterica ospite, i fagi si auto-regolano dal punto di vista della replicazione. La concentrazione di un antibiotico introdotto nel corpo umano dall'esterno infatti diminuisce nel tempo, mentre finché sono presenti cellule batteriche disponibili i fagi possono continuare a moltiplicarsi, diminuendo poi man mano che le cellule vengono eliminate.

Storia dei batteriofagi

L'uso dei fagi come profilassi e trattamento per svariate infezioni risale a molto tempo fa. Già nel 1917 Felix d'Herelle, dopo aver isolato il primo batteriofago, mise a punto una preparazione orale a base di fagi per trattare la dissenteria batterica. In seguito al suo successo, diversi laboratori e compagnie in Francia, Germania e Stati Uniti iniziarono a produrre preparazioni a base di lisato di fagi, ma nonostante il loro l'uso estensivo negli anni '30 la ricerca sulla terapia fagica e le sue applicazioni cliniche vennero in gran parte abbandonate nel mondo occidentale dopo la Seconda Guerra Mondiale. Questo è da attribuire alla scoperta, alla diffusione e al successo degli antibiotici ad ampio spettro e anche al non completo successo della terapia fagica in termini di risultati clinici, ridotta disponibilità di dati e ridotta comprensione della biologia dei fagi.

Gli antibiotici possono essere usati contro un'ampia gamma di patogeni mentre i batteriofagi sono efficaci solo nei confronti di uno specifico organismo target, e uno dei motivi di insuccesso della terapia fagica fu proprio la difficoltà nell'identificare accuratamente gli agenti eziologici, unita alla mancanza di protocolli per determinare *in vitro* la suscettibilità dei diversi batteri ai fagi. Gli antibiotici ad ampio spettro invece possono essere usati anche in assenza di una diagnosi specifica e questo costituisce un rilevante vantaggio dal punto di vista della praticità di utilizzo.

Contrariamente a quanto accadde nel mondo occidentale, nell'ex Unione Sovietica continuarono comunque le ricerche sui fagi e questi rimasero una risorsa del sistema sanitario dell'URSS anche negli anni '60 e '70. Essi continuarono ad essere usati per la profilassi e la terapia di molte infezioni batteriche, tra cui la dissenteria tifoide, le sepsi, le complicazioni delle ustioni o delle ferite.

Applicazioni dei batteriofagi

Per quanto riguarda l'uso dei virus batteriofagi nel trattamento delle infezioni, va considerato che è essenziale sapere esattamente quale specie batterica sta causando la patologia. Prima del trattamento il patogeno va identificato e *in vitro* va controllato qual è il fago più efficace contro di esso, tra quelli disponibili. È chiaro quindi come l'uso della terapia fagica nei contesti clinici attuali dipenda dalla disponibilità diagnostica. Inoltre è necessario anche avere prontamente disponibile un insieme di fagi, per individuare poi quello più adatto.

Batteriofagi e antibiotico-resistenza

L'insorgenza di resistenza verso i fagi da parte dei batteri avviene con frequenza significativamente minore rispetto a quanto osservato per la resistenza agli antibiotici, ma l'emergenza di mutanti resistenti ai fagi è comunque possibile e tipicamente consiste nella mutazione del recettore con cui il fago entra nella cellula. Per contrastare questo fenomeno vengono quindi utilizzati i cosiddetti *cocktails* di fagi, ovvero terapie costituite da un insieme di più fagi diversi. Essendo che i recettori per il fago sulla cellula sono molto specifici nei confronti dei differenti fagi, risulta essere virtualmente impossibile per la cellula batterica mutare in un modo tale da essere resistente ai vari tipi di fagi contenuti nell'insieme (Kutateladze *et al.*, 2010). Anche se la resistenza si verificasse tramite meccanismi diversi dalla modifica del recettore, la simultanea applicazione più fagi, uniti eventualmente a degli antibiotici, dovrebbe comunque ridurre la sopravvivenza dei batteri mutanti.

6.3.3 Microbiota

Il microbiota umano ha un impatto fondamentale sulla salute dell'organismo e sulla sua risposta immunitaria, e gli antibiotici comunemente usati non danneggiano solo i patogeni target ma possono anche eliminare gli altri commensali. Questo può fornire un'opportunità ai batteri opportunisti per colonizzare l'ambiente e causare infezioni anche gravi. Gli studi di S. Khanna e dei suoi colleghi (Khanna *et al.*, 2016) forniscono però un esempio di come si possa trattare la diarrea ricorrente da *C. difficile* e ristabilire il microbiota intestinale. La somministrazione di molteplici varie spore batteriche isolate da campioni fecali di un donatore sano ha infatti mostrato risultati promettenti nel prevenire la reinfezione. Dagli studi condotti è emerso che la competizione tra le varie specie ha determinato il ripristino di un microbiota sano e questo costituisce un importante punto di partenza anche per lo sviluppo di altre strategie basate sul microbiota, per il trattamento di patologie non solo intestinali ma anche respiratorie o sessualmente trasmesse (Micoli *et al.*, 2021).

6.4 *Traditional Medicine Strategy*

Con medicina tradizionale si intende un insieme di pratiche, conoscenze e filosofie per la salute e il benessere, originanti in contesti storici e culturali vari, che precedono e vengono distinte dalla cosiddetta "biomedicina", branca della scienza che applica i principi della biologia, della chimica e della fisica alla pratica clinica per comprendere, diagno-

sticare e trattare le malattie a livello molecolare e cellulare. La medicina tradizionale ha origine dall'esperienza ed enfatizza rimedi olistici e a base naturale, con un approccio personalizzato volto a ristorare l'equilibrio di mente, corpo e ambiente (World Health Organization, 2025).

Nel 2017 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha iniziato a sostenere lo sviluppo della medicina integrativa, che combina medicina "classica" e tradizionale, al fine di indagare il potenziale contributo di quest'ultima alla salute, mantenendo però un approccio basato sulle evidenze. Nel 2025 l'OMS ha elaborato la *Global traditional medicine strategy 2025–2034*, con lo scopo di diffondere un documento guida per i sistemi sanitari nel mondo e ridurre la disinformazione e le cattive pratiche, rifiutando le assunzioni non supportate da evidenze scientifiche. L'obiettivo è quindi quello di integrare pratiche di medicina tradizionale efficaci e sicure nei sistemi sanitari e favorire il contributo di queste pratiche nell'ottenere standard di cura più elevati. Con questo si vuole raggiungere una medicina integrativa, ossia un approccio alla salute interdisciplinare e basato sulle evidenze, derivante da una combinazione di biomedicina e medicina tradizionale in termini di conoscenze, abilità e pratiche. Nel documento si sottolinea anche l'importanza di basi scientifiche valide e di una regolamentazione adeguata al fine di sostenere un'integrazione della medicina tradizionale sicura per la salute. Inoltre, questa strategia risponde anche alle preoccupazioni sollevate dai gruppi di popolazioni indigene e dai detentori delle conoscenze tradizionali in merito alla protezione e alla conservazione di queste conoscenze. Gli obiettivi strategici definiti dall'OMS sono quattro: rafforzare le evidenze scientifiche riguardanti la medicina tradizionale; supportare l'erogazione di una medicina sicura ed efficace attraverso meccanismi regolatori appropriati; integrare la medicina tradizionale nei sistemi sanitari, quando sicura ed efficace; ottimizzare il valore della medicina tradizionale e aumentare il ruolo delle comunità.

6.4.1 Medicina tradizionale e premio Nobel: il caso di Tu Youyou per la cura della malaria

La scienziata cinese Tu Youyou ha ricevuto il premio Nobel per la Medicina nel 2015 per la scoperta dell'artemisina, una molecola oggi fondamentale nel trattamento della malaria e in particolare delle forme causate da *Plasmodium falciparum* resistenti ai farmaci tradizionali come la cloroquina.

La scoperta nacque da un programma di ricerca cinese avviato negli anni '60, chiamato Progetto 523, nel quale vennero studiate numerose piante della medicina tradizionale cinese alla ricerca di nuove terapie antimalariche. Tu Youyou concentrò l'attenzione su *Ar-*

temisia annua (*Qinghao* in cinese), utilizzata anticamente contro le “febbri intermittenti”, caratteristica clinica tipica della malaria.

Un elemento decisivo del suo lavoro fu l'analisi di antichi testi medici cinesi attribuiti a Ge Hong, che suggerivano di evitare la decozione della pianta e di utilizzare invece estrazioni a bassa temperatura. Tu Youyou intuì che il principio attivo poteva degradarsi con il calore elevato e sviluppò quindi metodi di estrazione con solventi a bassa temperatura, ovvero a 35°, prima con etanolo e poi con etere. Grazie a questa procedura riuscì a isolare nel 1972 il principio attivo responsabile dell'effetto antimalarico, ovvero l'artemisina (*Qinghaosu*).

Dal punto di vista farmacologico, l'artemisina è uno schizonticida ematico rapido e molto potente, che agisce contro le forme del parassita presenti nel sangue, responsabili dei sintomi della malaria. La sua efficacia deriva da una struttura chimica particolare, contenente un ponte endoperossido, che reagisce con il ferro presente nel parassita generando radicali liberi tossici capaci di danneggiarne rapidamente proteine e membrane cellulari. Questo meccanismo provoca la morte del *Plasmodium* in tempi molto rapidi.

Un altro aspetto importante è che l'artemisina possiede una struttura chimica completamente diversa da quella dei precedenti antimalarici e per questo motivo è efficace anche contro ceppi resistenti alla cloroquina. Successivamente furono sviluppati derivati più stabili e terapie combinate basate sull'artemisina (ACT, *Artemisinin-based Combination Therapies*), oggi considerate il trattamento standard della malaria nel mondo.

La scoperta di Tu Youyou rappresenta uno dei più importanti esempi di integrazione tra conoscenze della medicina tradizionale e ricerca biomedica moderna, in cui l'osservazione di una pratica terapeutica antica portò all'identificazione di una nuova classe di farmaci salvavita (Sotte, 2015; Ma *et al.*, 2020).

6.4.2 Considerazioni sulla medicina tradizionale

Nel trattare questo particolare tipo di medicina va sottolineato, come fatto anche dall'OMS, che il suo utilizzo e le iniziative a favore della sua integrazione nella biomedicina non possono esulare dall'essere basate, sempre ed in ogni caso, su evidenze scientifiche solide. La medicina tradizionale va pertanto intesa come una preziosa fonte di conoscenze che vanno però verificate, sia dal punto di vista dell'efficacia sia della sicurezza, tramite il metodo scientifico, al fine di garantire standard di cura elevati, investire correttamente le risorse economiche del singolo e dei sistemi sanitari e non arrecare danno ai pazienti.

6.5 Intelligenza artificiale

L'intelligenza artificiale sta emergendo come uno degli strumenti più promettenti per accelerare la scoperta di nuovi antibiotici, soprattutto in risposta alla crescente diffusione dell'antibiotico-resistenza. Secondo la review pubblicata su *Nature Publishing Group* nel 2021 (Melo *et al.*, 2021), gli algoritmi di *Machine Learning* e *Deep Learning* permettono di analizzare enormi spazi chimici e biologici impossibili da esplorare con i metodi tradizionali, selezionando rapidamente molecole con potenziale attività antimicrobica. I sistemi di intelligenza artificiale possono infatti prevedere non solo l'efficacia antibiotica di una sostanza, ma anche proprietà fondamentali come tossicità, stabilità, biodisponibilità e probabilità di sviluppo di resistenze. Un aspetto particolarmente innovativo è l'uso di reti neurali e modelli generativi capaci di progettare *de novo* molecole o peptidi antimicrobici, identificando strutture chimiche completamente differenti dagli antibiotici già esistenti. Questo approccio consente di cercare farmaci con nuovi meccanismi d'azione, riducendo il rischio di resistenza crociata. Inoltre, l'intelligenza artificiale può integrare dati genomici, strutturali e farmacologici per individuare bersagli batterici essenziali e prevedere le interazioni tra farmaco e patogeno. Sebbene la validazione sperimentale rimanga indispensabile, questi strumenti stanno riducendo drasticamente tempi e costi della ricerca farmacologica e potrebbero aprire la strada a una nuova generazione di antibiotici più efficaci e personalizzati.

Conclusioni

L'antibiotico-resistenza rappresenta una delle più gravi problematiche sanitarie del XXI secolo, con importanti ripercussioni cliniche, economiche e sociali a livello globale. Nel corso di questo elaborato sono stati approfonditi gli antibiotici, la loro storia e classificazione, i principali meccanismi molecolari attraverso cui i batteri sviluppano resistenza e le modalità con cui tali caratteristiche vengono selezionate e diffuse nelle popolazioni microbiche. È emerso come l'antibiotico-resistenza non sia un fenomeno recente né limitato all'ambito ospedaliero, ma una conseguenza naturale dell'adattamento dei microrganismi all'ambiente, accelerata però dall'utilizzo massivo e spesso inappropriato degli antimicrobici in medicina umana, veterinaria e agricoltura.

L'analisi dei meccanismi di resistenza ha evidenziato la significativa capacità adattativa dei batteri, infatti attraverso la riduzione della permeabilità al farmaco, l'attivazione di pompe di efflusso, la modifica del target antibiotico, l'inattivazione enzimatica del farmaco o l'attivazione di vie metaboliche alternative, i microrganismi riescono a sopravvivere anche in presenza di trattamenti antibiotici potenzialmente letali. La possibilità di combinare più meccanismi di difesa nello stesso ceppo batterico favorisce inoltre l'insorgenza di fenomeni di multiresistenza, rendendo alcune infezioni estremamente difficili da trattare e aumentando il rischio di fallimento terapeutico.

Particolarmente rilevante è il legame tra antibiotico-resistenza ed evoluzione biologica. La resistenza costituisce infatti un esempio concreto e osservabile di evoluzione in tempo reale, guidata dalla selezione naturale. Le mutazioni genetiche casuali che conferiscono un vantaggio in presenza di antibiotici vengono selezionate e trasmesse alle generazioni successive, determinando la progressiva diffusione dei ceppi resistenti. Tuttavia, molte mutazioni di resistenza comportano inizialmente un costo in termini di fitness biologica; nonostante ciò, l'emergere di mutazioni compensatorie consente ai batteri di ridurre o eliminare tali svantaggi, favorendo il mantenimento della resistenza anche in assenza della pressione antibiotica. Questo aspetto spiega perché la semplice riduzione dell'uso di antibiotici, pur essendo fondamentale, non sia sempre sufficiente a determinare una

regressione significativa delle resistenze già diffuse.

Un ulteriore elemento centrale è rappresentato dal trasferimento genico orizzontale, che consente ai batteri di acquisire rapidamente geni di resistenza da altri microrganismi mediante plasmidi, trasposoni e batteriofagi. Tale meccanismo accelera enormemente la diffusione delle resistenze tra specie differenti e contribuisce alla comparsa di patogeni multi-resistenti o pan-resistenti. Inoltre, il ruolo dell'ambiente e delle interazioni ecologiche tra microrganismi dimostra come l'antibiotico-resistenza debba essere interpretata all'interno di una rete complessa che coinvolge uomo, animali ed ecosistemi.

Alla luce di queste considerazioni, risulta evidente che il contrasto all'antibiotico-resistenza richiede strategie integrate e multidisciplinari. L'approccio *One Health* rappresenta oggi uno dei modelli più efficaci, poiché riconosce la stretta connessione tra salute umana, salute animale e ambiente. Anche i programmi di *Antimicrobial Stewardship* sono fondamentali per promuovere un utilizzo più razionale degli antibiotici, ridurre le prescrizioni inappropriate e limitare la pressione selettiva che favorisce l'emergere di ceppi resistenti. Va comunque ricordato che anche le misure di prevenzione delle infezioni, la sorveglianza epidemiologica e il miglioramento delle pratiche igienico-sanitarie rivestono un ruolo essenziale nel contenimento del fenomeno.

La ricerca scientifica continua ad avere un'importanza determinante nella lotta contro l'antibiotico-resistenza. Accanto allo sviluppo di nuovi antibiotici, è da sottolineare l'emergenza di approcci innovativi come l'utilizzo di batteriofagi, gli oligonucleotidi antisense e le terapie mirate sul microbiota. Anche l'intelligenza artificiale sta assumendo un ruolo sempre più rilevante, grazie alla possibilità di analizzare grandi quantità di dati biologici, identificare nuovi composti antimicrobici e prevedere l'evoluzione delle resistenze. Allo stesso tempo, l'interesse verso la medicina tradizionale e le sostanze naturali potrebbe offrire ulteriori prospettive terapeutiche complementari.

In conclusione, l'antibiotico-resistenza non deve essere considerata esclusivamente come una problematica microbiologica o clinica, ma come un fenomeno evolutivo globale strettamente legato alle attività umane e agli equilibri ecologici. La capacità dei batteri di adattarsi rapidamente impone un costante aggiornamento delle conoscenze scientifiche e delle strategie terapeutiche. Solo attraverso investimenti continui nella ricerca, nella cooperazione internazionale, nella sensibilizzazione della popolazione e nell'adozione di politiche sanitarie sostenibili sarà possibile limitare la diffusione delle resistenze e preservare l'efficacia degli antibiotici, una delle conquiste più importanti della medicina moderna.

Bibliografia

- Agenzia Italiana del Farmaco. (2018). *Glossario degli antibiotici* [Accesso il 5 aprile 2025]. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/0/Glossario_Antibiotici.pdf
- Agenzia Italiana del Farmaco. (2024). *Dossier AIFA: Antibiotico-resistenza* [Accesso il 5 aprile 2025]. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/2604032/Dossier_stampa_AIFA_Antibiotico-resistenza_2024.pdf
- Alsan, M., Atella, V., Bhattacharya, J., Conti, V., Mejía-Guevara, I., & Miller, G. (2021). Technological progress and health convergence: the case of penicillin in postwar Italy. *Demography*, 58(4), 1473–1498.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134.
- Andrews, J. R., Shah, N. S., Weissman, D., Moll, A. P., Friedland, G., & Gandhi, N. R. (2010). Predictors of multidrug-and extensively drug-resistant tuberculosis in a high HIV prevalence community. *PloS one*, 5(12), e15735.
- Arnold, B., Sohail, M., Wadsworth, C., Corander, J., Hanage, W. P., Sunyaev, S., & Grad, Y. H. (2020). Fine-scale haplotype structure reveals strong signatures of positive selection in a recombining bacterial pathogen. *Molecular Biology and Evolution*, 37(2), 417–428.
- Arnold, B. J., Huang, I.-T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 206–218.
- Ayhan, D. H., Tamer, Y. T., Akbar, M., Bailey, S. M., Wong, M., Daly, S. M., Greenberg, D. E., & Toprak, E. (2016). Sequence-specific targeting of bacterial resistance genes increases antibiotic efficacy. *PLoS biology*, 14(9), e1002552.
- Baquero, F. (2001). Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resistance Updates*, 4(2), 93–105.
- Bassett, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L., & Villanueva, A. R. (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350). *Science*, 209(4464), 1532–1534.

- Bell, B. G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H., & Pringle, M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC infectious diseases*, 14(1), 13.
- Bottery, M. J., Pitchford, J. W., & Friman, V.-P. (2021). Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *The ISME journal*, 15(4), 939–948.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320–330.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247.
- Cai, T. (2018). Trattamento antibiotico empirico, mirato o ragionato? Dalla pratica clinica alle Linee Guida EAU 2017. *Urologia Journal*, 85(1_suppl), S14–S19.
- Carvajal-Garcia, J., Samadpour, A. N., Hernandez Viera, A. J., & Merrikh, H. (2023). Oxidative stress drives mutagenesis through transcription-coupled repair in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(27), e2300761120.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016). *One Health History* [Accessed: 2026-05-07]. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.cdc.gov/one-health/about/one-health-history.html>
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garraza, M. E., Bourke, J., Wells, D. J., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *The Lancet*, 378(9791), 595–605.
- Comas, I., Borrell, S., Roetzer, A., Rose, G., Malla, B., Kato-Maeda, M., Galagan, J., Niemann, S., & Gagneux, S. (2012). Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nature genetics*, 44(1), 106–110.
- Cook, M., Molto, E., & Anderson, C. (1989). Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *American journal of physical anthropology*, 80(2), 137–143.
- Couce, A., & Tenaillon, O. A. (2015). The rule of declining adaptability in microbial evolution experiments. *Frontiers in genetics*, 6, 99.
- Coyne, A. J. K., Stamper, K., Kebriaei, R., Holger, D. J., El Ghali, A., Morrisette, T., Biswas, B., Wilson, M., Deschenes, M. V., Canfield, G. S., et al. (2022). Phage cocktails with daptomycin and ampicillin eradicates biofilm-embedded multidrug-

- resistant *Enterococcus faecium* with preserved phage susceptibility. *Antibiotics*, 11(9), 1175.
- Crofton, J., & Mitchison, D. (1948). Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *British medical journal*, 2(4588), 1009.
- Cui, L., & Su, X.-z. (2009). Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert review of anti-infective therapy*, 7(8), 999–1013.
- Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280–295.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417–433.
- Dickson, S. D., & Salazar, K. C. (2013). Diagnosis and management of immediate hypersensitivity reactions to cephalosporins. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 45(1), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8367-x>
- Domagk, G. (1935). Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 61(07), 250–253.
- Durão, P., Balbontín, R., & Gordo, I. (2018). Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*, 26(8), 677–691.
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.-M., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., et al. (2010). Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 48.
- Elwell, L. P., Roberts, M., Mayer, L. W., & Falkow, S. (1977). Plasmid-mediated beta-lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 11(3), 528–533.
- Engelstädter, J., & Moradigaravand, D. (2014). Adaptation through genetic time travel? Fluctuating selection can drive the evolution of bacterial transformation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775).
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016–2020. *Stockholm: ECDC*.
- European Commission, Health Emergency Preparedness and Response Authority (HERA). (2022, luglio 8). *HERA factsheet – Health Union: Identifying top 3 priority health threats* (Accessed: 2026-05-11). European Commission. https://health.ec.europa.eu/publications/hera-factsheet-health-union-identifying-top-3-priority-health-threats_en

- Falkinham III, J. O., Wall, T. E., Tanner, J. R., Tawaha, K., Alali, F. Q., Li, C., & Oberlies, N. H. (2009). Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2735–2741.
- Fernández, L., Breidenstein, E. B., & Hancock, R. E. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 1–21.
- Fernández, L., & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 661–681.
- Gottesman, B. S., Carmeli, Y., Shitrit, P., & Chowers, M. (2009). Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 869–875.
- Grimsey, E. M., Weston, N., Ricci, V., Stone, J. W., & Piddock, L. J. (2020). Overexpression of RamA, which regulates production of the multidrug resistance efflux pump AcrAB-TolC, increases mutation rate and influences drug resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(4), 10–1128.
- Hall, B. G., & Barlow, M. (2004). Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug resistance updates*, 7(2), 111–123.
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M. J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., Garc   Tabernero, A., Garc  -Vargas, S., De La Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., et al. (2012). Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617–626.
- Hughes, D., & Andersson, D. I. (2017). Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. *Annual review of microbiology*, 71(1), 579–596.
- Istituto della Enciclopedia Italiana. (2025). *Antibiotico* [Accesso il 5 aprile 2025]. <https://www.treccani.it/enciclopedia/antibiotico>
- Istituto Superiore di Sanit  . (2024, maggio). *Sorveglianza nazionale dell'antibiotico-resistenza. Rapporto nazionale 2023* (rapp. tecn.) (Rapporto ISS, 5/2024). Istituto Superiore di Sanit  . https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/RIS-5_2024.pdf
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana. (2020, novembre). Trattamenti e sviluppo di resistenza dei principali endoparassiti [[PDF]].
- Jayachandran, S., Lleras-Muney, A., & Smith, K. V. (2010). Modern medicine and the twentieth century decline in mortality: Evidence on the impact of sulfa drugs. *American Economic Journal: Applied Economics*, 2(2), 118–146.

-
- Khanna, S., Pardi, D. S., Kelly, C. R., Kraft, C. S., Dhere, T., Henn, M. R., Lombardo, M.-J., Vulic, M., Ohsumi, T., Winkler, J., et al. (2016). A novel microbiome therapeutic increases gut microbial diversity and prevents recurrent *Clostridium difficile* infection. *The Journal of infectious diseases*, 214(2), 173–181.
- Kirby, W. M. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, 99(2579), 452–453.
- Kobayashi, T., Nonaka, L., Maruyama, F., & Suzuki, S. (2007). Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 65(3), 228–235.
- Kutateladze, M., & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology*, 28(12), 591–595.
- Languages, O. (2025). Finalism.
- Le Couteur, P., & Burrenson, J. (2006). *I bottoni di Napoleone. Come 17 molecole hanno cambiato la storia* (1^a ed.). Longanesi.
- Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2010). Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 467(7311), 82–85.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(Suppl 12), S122–S129.
- Li, M.-c., Lu, J., Lu, Y., Xiao, T.-y., Liu, H.-c., Lin, S.-q., Xu, D., Li, G.-l., Zhao, X.-q., Liu, Z.-g., et al. (2021). rpoB mutations and effects on rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Drug Resistance*, 4119–4128.
- Li, X.-Z., Livermore, D. M., & Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump (s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(8), 1732–1741.
- Liu, J.-H., Liu, Y.-Y., Shen, Y.-B., Yang, J., Walsh, T. R., Wang, Y., & Shen, J. (2024). Plasmid-mediated colistin-resistance genes: mcr. *Trends in microbiology*, 32(4), 365–378.
- Ma, N., Zhang, Z., Liao, F., Jiang, T., & Tu, Y. (2020). The birth of artemisinin. *Pharmacology & therapeutics*, 216, 107658.
- MacLean, R. C., & Vogwill, T. (2015). Limits to compensatory adaptation and the persistence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Evolution, medicine, and public Health*, 2015(1), 4–12.
- MacNair, C. R., Rutherford, S. T., & Tan, M.-W. (2024). Alternative therapeutic strategies to treat antibiotic-resistant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 22(5), 262–275.

- Manavathu, E. K., Fernandez, C., Cooperman, B., & Taylor, D. (1990). Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet (O). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(1), 71–77.
- Matta, R., et al. (2018). A multicenter retrospective study in Lebanon. *Journal of Infection and Public Health*, 11(3), 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.11.023>
- Melo, M. C., Maasch, J. R., & de la Fuente-Nunez, C. (2021). Accelerating antibiotic discovery through artificial intelligence. *Communications biology*, 4(1), 1050.
- Mesfin, Y. M., Hailemariam, D., Biadglign, S., & Kibret, K. T. (2014). Association between HIV/AIDS and multi-drug resistance tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 9(1), e82235.
- Micoli, F., Bagnoli, F., Rappuoli, R., & Serruto, D. (2021). The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 19(5), 287–302.
- Mishra, N. N., Bayer, A. S., Tran, T. T., Shamoo, Y., Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Guan, Z., & Arias, C. A. (2012). Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content.
- Moore, J. M., Correa, R., Rosenberg, S. M., & Hastings, P. (2017). Persistent damaged bases in DNA allow mutagenic break repair in *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 13(7), e1006733.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, 399(10325), 629–655.
- Murray, L. M., Hayes, A., Snape, J., Kasprzyk-Hordern, B., Gaze, W. H., & Murray, A. K. (2024). Co-selection for antibiotic resistance by environmental contaminants. *npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 9.
- Murray, P. R., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2021). *Microbiologia medica* 9 ed.
- Nabyonga-Orem, J. (2014, ottobre). Health monitor: the Contents [consultato pagina 27]. https://www.researchgate.net/publication/266394658_Health_monitor_the_Contents
- Nakae, T. (1976). Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(3), 877–884.
- Nelson, M. L., Dinardo, A., Hochberg, J., & Armelagos, G. J. (2010). Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains

- of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American journal of physical anthropology*, 143(1), 151–154.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78(1), 119–146.
- Nolivos, S., Cayron, J., Dedieu, A., Page, A., Delolme, F., & Lesterlin, C. (2019). Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science*, 364(6442), 778–782.
- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations* (Accessed: 2026-05-07). Review on Antimicrobial Resistance. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Organization, W. H., et al. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological reviews*, 60(4), 575–608.
- Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629–636.
- Pievani, T. (2024). *Tutti i mondi possibili. Un'avventura nella grande biblioteca dell'evoluzione*. Raffaello Cortina Editore.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20–51.
- Poole, K., Krebes, K., McNally, C., & Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of bacteriology*, 175(22), 7363–7372.
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(2), 326–356.
- Santos, R. D., Raal, F. J., Catapano, A. L., Witztum, J. L., Steinhagen-Thiessen, E., & Tsimikas, S. (2015). Mipomersen, an antisense oligonucleotide to apolipoprotein B-100, reduces lipoprotein (a) in various populations with hypercholesterolemia: results of 4 phase III trials. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(3), 689–699.
- Saw, H. T., Webber, M. A., Mushtaq, S., Woodford, N., & Piddock, L. J. (2016). Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae to carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1510–1519.

- Schaenzer, A. J., & Wright, G. D. (2020). Antibiotic resistance by enzymatic modification of antibiotic targets. *Trends in molecular medicine*, 26(8), 768–782.
- Seppälä, H., Klaukka, T., Vuopio-Varkila, J., Muotiala, A., Helenius, H., Lager, K., Huovinen, P., & for Antimicrobial Resistance, F. S. G. (1997). The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *New England Journal of Medicine*, 337(7), 441–446.
- Shukla, R., Peoples, A. J., Ludwig, K. C., Maity, S., Derks, M. G., De Benedetti, S., Krueger, A. M., Vermeulen, B. J., Harbig, T., Lavore, F., et al. (2023). An antibiotic from an uncultured bacterium binds to an immutable target. *Cell*, 186(19), 4059–4073.
- Società Italiana di Farmacia Ospedaliera e dei Servizi Farmaceutici delle Aziende Sanitarie. (2017). *Antimicrobial Stewardship in medicina*. Recuperato maggio 7, 2026, da https://www.sifoweb.it/images/pdf/pubblicazioni/altre-edizioni/antimicrobial-stewardship/Antimicrobial_Stewardship_in_medicina.pdf
- Sotte, L. (2015). Il Nobel per la medicina assegnato alla dott.ssa Tu Youyou per la “riscoperta” di un antico farmaco della medicina tradizionale cinese. *Olos e Logos*. <https://www.oloselogos.it/wp-content/uploads/2015/10/tu-you1.pdf>
- Starikova, I., Al-Haroni, M., Werner, G., Roberts, A. P., Sørum, V., Nielsen, K. M., & Johnsen, P. J. (2013). Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2755–2765.
- Tamburello, M., & Villone, G. (2017). Vincenzo Tiberio: La prima antibiotico-terapia sperimentale in vivo. *Medicina nei Secoli. Arte e Scienza*, 29(2), 533–552.
- Then, R. L. (1982). Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Reviews of infectious diseases*, 4(2), 261–269.
- Van Klingeren, B., Van Embden, J., & Dessens-Kroon, M. (1977). Plasmid-mediated chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(3), 383–387.
- 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.
- Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M., & Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), 1515–1521.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(3), 577–585.

- West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A., & Diggle, S. P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nature reviews microbiology*, 4(8), 597–607.
- Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., Breen, J., Morris, A. G., Alt, K. W., Caramelli, D., Dresely, V., et al. (2017). Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature*, 544(7650), 357–361.
- Wildlife Conservation Society. (2004). *The Manhattan Principles: Building Interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World*. Recuperato maggio 7, 2026, da <https://oneworldonehealth.wcs.org/About-Us/Mission/The-Manhattan-Principles.aspx>
- Wilson, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 637–648.
- Wilson, P., Andrews, J., Charlesworth, R., Walesby, R., Singer, M., Farrell, D., & Robbins, M. (2003). Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 186–188.
- Wong, R., Hagg, U., Samaranayake, L., Yuen, M., Seneviratne, C., & Kao, R. (2010). Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 39(6), 599–605.
- World Health Organization. (2024). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2024* (rapp. tecn.) (ISBN: 978-92-4-009346-1). World Health Organization. Geneva. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf>
- World Health Organization. (2025). *Global Traditional Medicine Strategy 2025–2034*. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/cf37a4ad-4d27-4244-a7ee-001de39841ee/content>
- Wright, G., Jangra, M., Travin, D., Aleksandrova, E., Kaur, M., Darwish, L., Koteva, K., Klepacki, D., Wang, W., Tiffany, M., et al. (2024). A Broad Spectrum Lasso Peptide Antibiotic Targeting the Bacterial Ribosome. *Research Square*, rs–3.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews microbiology*, 5(3), 175–186.
- Yang, S.-J., Xiong, Y. Q., Dunman, P. M., Schrenzel, J., François, P., Peschel, A., & Bayer, A. S. (2009). Regulation of *mprF* in daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2636–2637.

Zazzi, M., Hu, H., & Prosperi, M. (2018). The global burden of HIV-1 drug resistance in the past 20 years. *PeerJ*, 6, e4848.

Allegato 1

The Manhattan Principles

As defined during the meeting titled
Building Interdisciplinary Bridges to Health in a “Globalized World” held in 2004

Background

In September 2004, WCS convened health experts from around the world to discuss the movements of diseases among human, domestic animal, and wildlife populations. Held at Rockefeller University in New York City, the symposium set priorities for an international, interdisciplinary strategy for combating threats to the health of life on Earth.

The Manhattan Principles

These “Manhattan Principles” urge world leaders, civil society, the global health community, and institutions of science to holistically approach the prevention of epidemic/epizootic disease and the maintenance of ecosystem integrity by:

1. Recognizing the link between human, domestic animal, and wildlife health, and the threat disease poses to people, their food supplies and economies, and the biodiversity essential to maintaining the healthy environments and functioning ecosystems we all require.
2. Recognizing that decisions regarding land and water use have real implications for health. Alterations in the resilience of ecosystems and shifts in patterns of disease emergence and spread manifest themselves when we fail to recognize this relationship.
3. Including wildlife health science as an essential component of global disease prevention, surveillance, monitoring, control, and mitigation.

4. Recognizing that human health programs can greatly contribute to conservation efforts.
5. Devising adaptive, holistic, and forward-looking approaches to the prevention, surveillance, monitoring, control, and mitigation of emerging and resurging diseases that fully account for the complex interconnections among species.
6. Seeking opportunities to fully integrate biodiversity conservation perspectives and human needs (including those related to domestic animal health) when developing solutions to infectious disease threats.
7. Reducing demand for and better regulating the international live wildlife and bushmeat trade, not only to protect wildlife populations but to lessen the risks of disease movement, crossspecies transmission, and the development of novel pathogen-host relationships. The costs of this worldwide trade in terms of impacts on public health, agriculture, and conservation are enormous, and the global community must address this trade as the real threat it is to global socioeconomic security.
8. Restricting the mass culling of free-ranging wildlife species for disease control to situations where there is a multidisciplinary, international scientific consensus that a wildlife population poses an urgent, significant threat to human health, food security, or wildlife health more broadly.
9. Increasing investment in the global human and animal health infrastructure commensurate with the serious nature of emerging and resurging disease threats to people, domestic animals and wildlife. Enhanced capacity for global human and animal health surveillance and for clear, timely information-sharing (that takes language barriers into account) can only help improve coordination of responses among governmental and nongovernmental agencies, public and animal health institutions, vaccine / pharmaceutical manufacturers, and other stakeholders.
10. Forming collaborative relationships among governments, local people, and the private and public (i.e. non-profit) sectors to meet the challenges of global health and biodiversity conservation.
11. Providing adequate resources and support for global wildlife health surveillance networks that exchange disease information with the public health and agricultural animal health communities as part of early warning systems for the emergence and resurgence of disease threats.

12. Investing in educating and raising awareness among the world's people and in influencing the policy process to increase recognition that we must better understand the relationships between health and ecosystem integrity to succeed in improving prospects for a healthier planet.