



RASSEGNA

DI DIRITTO, LEGISLAZIONE

E

MEDICINA LEGALE VETERINARIA

ANNO XX

Reg. Trib. Di Milano N. 174/67 del 29 maggio 1967-ISSN 0300-3485

Redazione

Direttore editoriale

Direttore scientifico

Progetto grafico di copertina ed impaginazione

Prof. Giancarlo Ruffo

Prof.ssa Paola Fossati

Luca Modolo

Hanno collaborato a questo numero

Dott.Ssa Francesca Bellini, Dott. Alberto Cal, Dott.Ssa Alessia
Liverini, Dott.Ssa Giuliana Pagani, Dott.Ssa Sara Zacchetti



F. BELLINI, A. CAL, A. LIVERINI, G. PAGANI, S. ZACCHETTI



FARMACI ANTIMICROBICI: ASPETTI CHIMICI, RESISTENZA, MONITORAGGIO E RICADUTE AMBIENTALI

ANTIMICROBIAL DRUGS: CHEMICAL ASPECTS, RESISTANCE, TRACKING AND ENVIRONMENTAL IMPACTS

DOTT.SSA FRANCESCA BELLINI (1), DOTT. ALBERTO CAL (2), DOTT.SSA
ALESSIA LIVERINI (3), DOTT.SSA GIULIANA PAGANI (4), DOTT.SSA SARA
ZACCHETTI (5)

- (1) *Dirigente veterinario Asl Roma 1*
(2) *Medico Veterinario libero professionista*
(3) *Dirigente veterinario Asl Roma 4*
(4) *Tecnico della Prevenzione Asl Roma 1*
(5) *Chimica, Barcellona*

3

Parole chiave: resistenza agli antibiotici, meccanismi biochimici, disseminazione, costo di benessere, trasferimento genico orizzontale, rischi per la salute umana, ecologia microbica

Key words: Resistance to antibiotics, biochemical mechanisms, spreading, fitness cost, horizontal gene transfer, human health risks, microbic ecology.

Riassunto

Negli ultimi anni è emerso il grave problema della resistenza agli antibiotici nei microrganismi, che rappresenta una profonda minaccia per la salute globale.

I microrganismi resistenti ai farmaci provenienti da fonti antropogeniche e allevamenti zootecnici di tipo intensivo hanno posto serie sfide ambientali e sanitarie.

I geni resistenti agli antibiotici che costituiscono il “resistoma” ambientale vengono trasferiti a batteri patogeni dell’uomo e degli animali. E’ estremamente importante comprendere l’origine ed il meccanismo di trasferimento di questi fattori genetici in agenti patogeni per poter elaborare strategie di interventi terapeutici idonei a limitare le infezioni, ma anche per scongiurare la minaccia della resistenza microbica ai farmaci.

Per intraprendere misure preventive è quindi fondamentale indagare in quali condizioni e fino a che punto avviene la selezione ambientale per la resistenza. Tuttavia, manca ancora una comprensione più profonda dei processi evolutivi ed ecologici che portano alla comparsa clinica dei geni di resistenza ed alla conoscenza delle barriere di dispersione ambientale. Medici, veterinari e chimici sono chiamati a lavorare insieme con l'obiettivo comune di prevenire l'esposizione superflua di agenti patogeni agli antibiotici in contesti non clinici.

Abstract

In recent years the severe problem of antibiotic resistance in microorganisms has emerged hence representing a deep threat to global health.

Microorganisms resistant to drugs deriving from anthropogenic sources and intensive livestock farming have set serious environmental and health challenges.

Antibiotic-resistant genes that form the environmental "resistoma" are transferred to human and animal pathogenic bacteria. It's extremely important to comprehend the origin and transfer mechanisms of such genetic factors in pathogenic agents in order to elaborate therapeutic intervention strategies, consequently limiting infections and preventing microbic resistance to drugs.

In order to take preventive measures it is therefore fundamental to investigate in what conditions and at what point the environmental selection for resistance takes place. However, what is still lacking is a deeper insight of the evolutionary and ecological processes that lead to the clinical appearance of resistance genes and to the understanding of environmental dispersion barriers. Doctors, veterinaries, and chemists are called upon to work together with the common goal of preventing unnecessary exposure of pathogens to antibiotics in non-clinical contexts.

1. INTRODUZIONE

Fino agli inizi del secolo scorso, prima della scoperta degli antibiotici, non esistevano terapie contro i batteri patogeni e malattie quali tubercolosi, tonsillite da streptococco, meningite, etc. risultavano letali (Zaffiri, Gardner e Toledo-Pereyra, 2012).

Il termine antibiotico trae la sua origine dal greco, ed è composto dal prefisso "anti" che significa "contro" e dalla parola "bios" che esprime il concetto di "vita" dal punto di vista biologico (Harris, 1964), pertanto letteralmente significa "contro la vita".

Infatti, l'antibiotico contrasta i batteri uccidendoli (attività battericida) o impedendone la riproduzione (attività batteriostatica), causando il minor danno possibile all'organismo ospite. Ciò si verifica grazie al meccanismo di tossicità selettiva, basato sulle differenze tra le cellule procariote ed eucariote, che permettono agli antibiotici di agire selettivamente su un bersaglio presente nel batterio ed assente nelle cellule dell'ospite.

I prodotti di origine naturale (generalmente originati dal metabolismo di muffe o miceti o da altri batteri) sono detti antibiotici, mentre quelli ottenuti per sintesi chimica sono denominati

chemioterapici (SITOX Società Italiana di Tossicologia, 2020).

Tale distinzione, tuttavia, risulta meno netta poiché alcuni di questi farmaci sono generati per modificazioni chimiche di prodotti naturali (antibiotici semisintetici), mentre altri, pur avendo origine naturali, sono attualmente ottenuti interamente per sintesi chimica.

Pertanto, nel linguaggio comune, il termine antibiotico viene spesso utilizzato come sinonimo di farmaco antibatterico (Antonelli et al., 2017).

Nonostante tali molecole siano estremamente efficaci ed abbiano rappresentato una grande scoperta nella medicina in senso lato - e nello specifico nella terapia antibatterica - aumentando notevolmente le aspettative di vita, tuttavia, i batteri tendono a sviluppare resistenza nei loro confronti, diventandone insensibili (Menkem et al., 2019). Infatti, con la somministrazione della terapia, se è vero che vengono contrastati gli effetti delle cellule batteriche suscettibili al farmaco impiegato, è altrettanto vero che si selezionano quei ceppi che resistono, continuando a moltiplicare, grazie ad un processo di selezione darwiniano (Founou, Founou e Essack, 2016).

Nel tempo, riproducendosi, questi batteri diventano la popolazione predominante e trasmettono le loro caratteristiche di resistenza alla progenie (Apata, 2009), che impara ad adattarsi a condizioni di vita sfavorevoli, aumentando la capacità di sopravvivere e/o riprodursi anche in presenza di una determinata concentrazione di antibiotico che precedentemente risultava sufficiente ad inibirne la crescita o, addirittura, ad eliminarla.

Inizialmente non si conoscevano tutti gli effetti degli antibiotici sui batteri e la

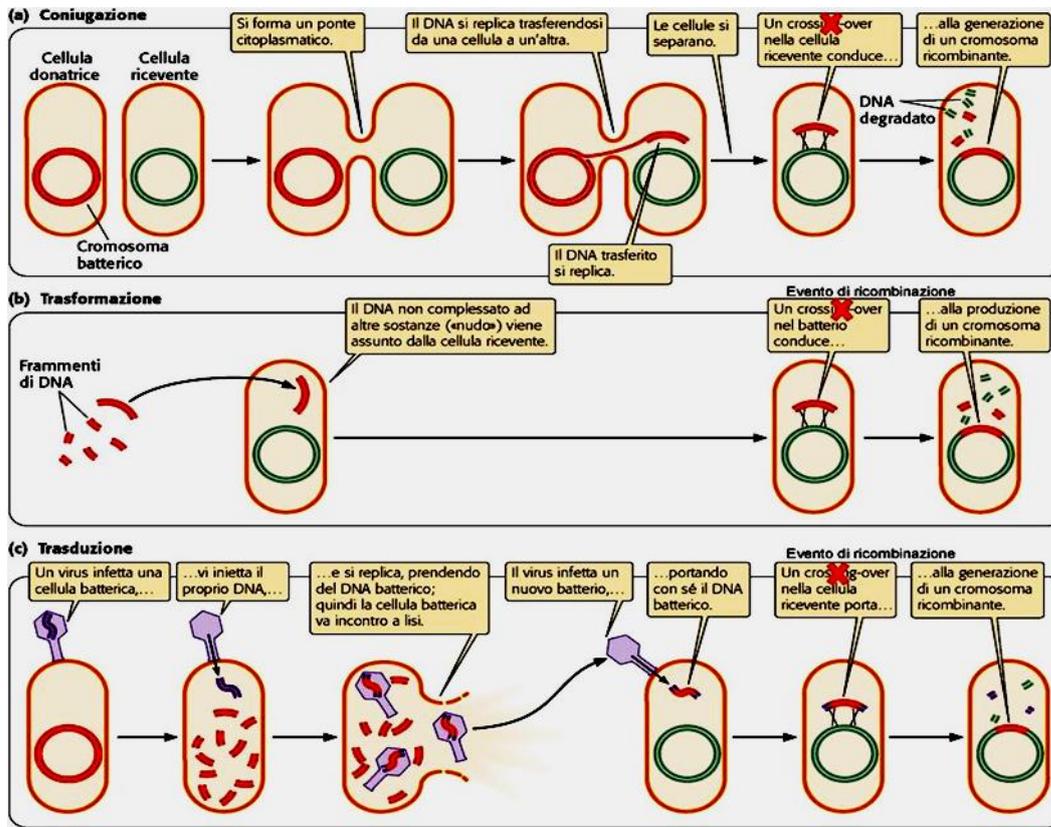
continua scoperta di nuove molecole ha permesso che si selezionassero germi patogeni resistenti (Nathan, 2004).

Il fenomeno della farmaco-resistenza è imputato alla trasmissione di materiale genetico:

- di tipo verticale o passaggio inter-generazionale (VGT, *vertical gene transmission*) da “cellula madre” a “cellula figlia”: avviene indipendentemente dalla presenza dell’antibiotico, solitamente queste mutazioni vengono corrette da meccanismi cellulari, per cui si verificano raramente (Holmes et al., 2016; Menkem et al., 2019);

- di tipo orizzontale: (i batteri che occupano uno stesso spazio fisico possono acquisire materiale genetico estraneo e inserirlo nel proprio DNA, aumentando la possibilità di trasferire la resistenza ad altri batteri, anche di specie diverse) la dislocazione di geni batterici in grado di conferire resistenza avviene tramite elementi mobili quali plasmidi (1) (Intorre Luigi, 2009), integroni (2), trasposoni o *jumping genes* (3) (Giguère, Prescott e Dowling, 2013), frequenze di inserzione (4) e batteriofagi, utilizzando i sistemi di coniugazione (trasferimento di DNA da un batterio donatore ad uno destinatario tramite i pili sessuali), trasformazione (acquisizione di DNA presente nell’ambiente da parte della cellula destinataria) o trasduzione (inserimento di DNA nella cellula destinataria tramite un batteriofago vettore) (Founou, Founou e Essack, 2016).

Tali meccanismi possono essere classificati in base alla via biochimica coinvolta.



Modalità di trasmissione orizzontale di materiale genetico in caso di resistenza acquisita (da: Pierce, B. A. (2016). *Genetica, Italia: Zanichelli*)

§

2. RESISTENZA

Meccanismi biochimici di resistenza

La cellula batterica mette in atto strategie per impedire l'interazione del farmaco con il bersaglio molecolare.

I principali meccanismi biochimici di resistenza sono:

A) **Inattivazione enzimatica:** in questo caso lo sviluppo della resistenza è dovuto alla produzione di enzimi capaci di

creare modifiche al farmaco, tali da renderlo incapace ad interagire con il bersaglio cellulare. Questo meccanismo si manifesta frequentemente nella resistenza ai beta-lattamici, agli aminoglicosidi e al cloramfenicolo. Il più noto meccanismo di resistenza per inattivazione enzimatica è quello che prevede l'idrolisi dell'anello beta-lattamico ad opera degli enzimi beta-lattamasi di origine batterica; tale anello idrolizzato non è più in grado di interagire con il bersaglio molecolare e di inibire la sintesi della parete batterica. L'utilizzo di queste molecole come terapia antimicrobica ha sempre

comportato la diffusione di ceppi batterici produttori di enzimi in grado di inattivarle (Antonelli et al., 2017).

B) Riduzione dell'accumulo intracellulare per ridotta penetrazione: la resistenza è dovuta all'incapacità del farmaco di penetrare gli involucri della cellula batterica. La riduzione della permeabilità può essere causata da alterazioni a carico dei lipopolisaccaridi che comportano una ridotta penetrazione intracellulare degli aminoglicosidi oppure da una ridotta produzione, mutazioni o la perdita dei canali porinici (5) che determinano un calo della concentrazione intracellulare di farmaci quali tetracicline, beta-lattamine e fluorochinoloni (Intorre Luigi, 2009; Antonelli et al., 2017).

C) Riduzione dell'accumulo intracellulare per aumentata estrusione: i batteri fanno ricorso ai sistemi di efflusso (6) per espellere determinate classi di antibiotici utilizzando come fonte di energia l'ATP oppure il gradiente protonico di membrana: gli antibiotici vengono pompati fuori dalla cellula da specifiche proteine di membrana più velocemente di quanto non riescano ad entrare e le concentrazioni intracitoplasmatiche non raggiungono livelli tali da inibire le sintesi proteiche. L'efflusso si può verificare attraverso: sistemi ad ampio spettro, codificati da geni cromosomici che espellono dalla cellula batterica composti strutturalmente molto diversi come fluorochinoloni, fenicolati e macrolidi e mediante pompe di efflusso specifiche che espellono solo determinate famiglie di antibatterici. Sono generalmente codificati da geni a localizzazione plasmidica acquisiti per trasferimento genico orizzontale, attivi nei confronti delle tetracicline, dei

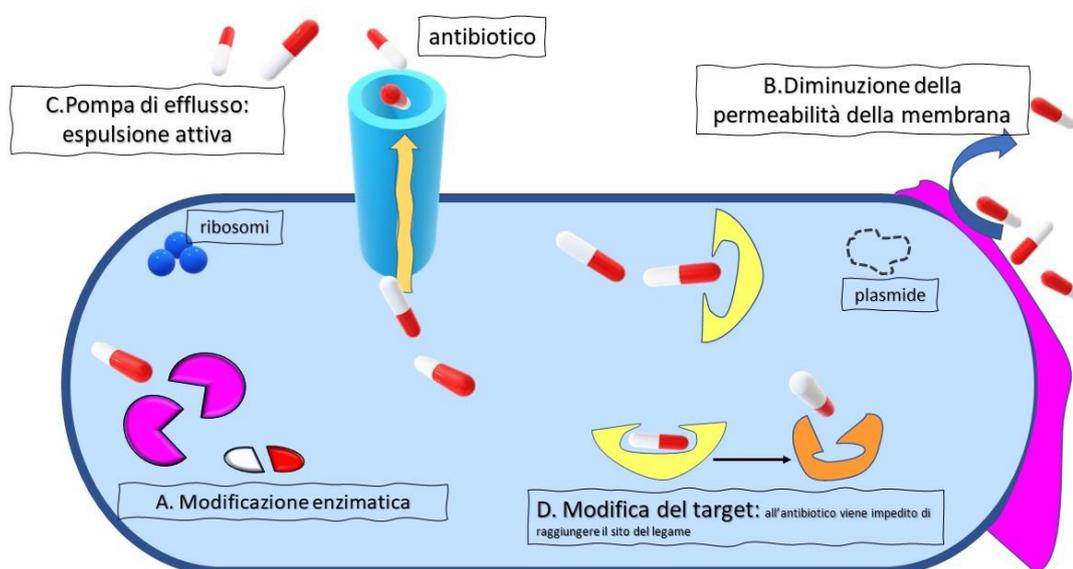
fenicoli e dei macrolidi (Antonelli et al., 2017).

D) Alterazione del sito di attività: la resistenza è dovuta ad una modificazione del bersaglio molecolare che previene l'interazione con l'antibiotico. Può dipendere da una modificazione biochimica del sito ribosomiale (conferisce resistenza a macrolidi e aminoglicosidi), oppure può essere dovuta all'acquisizione di proteine bersaglio che presentano ridotta affinità per i chemioterapici, come avviene, a titolo esemplificativo, nello *Streptococcus pneumoniae*, in cui la resistenza alla penicillina e ad altri beta-lattamici è conseguente a fenomeni di ricombinazione che comportano la formazione di geni che codificano PBP (7), con ridotta affinità per questi farmaci. (Antonelli et al., 2017).

La resistenza può dipendere anche da proteine che si legano con il farmaco, inibendo il legame con il bersaglio molecolare. Per esempio i fattori di protezione ribosomiale Tet (8) proteggono i ribosomi dall'interazione con le tetracicline conferendo resistenza; i fattori di protezione Qnr (proteine di resistenza ai chinoloni) proteggono le DNA topoisomerasi dall'interazione con i chinoloni conferendo resistenza.

Infine, vi è la possibilità che il bersaglio molecolare non venga modificato, ma il batterio acquisisca un nuovo enzima, insensibile all'inibizione, in grado di svolgere le stesse funzioni biologiche svolte dal bersaglio molecolare bloccato dal farmaco antibatterico. Un esempio è rappresentato dalla resistenza a sulfamidici e trimetropin che frequentemente consegue all'acquisizione di geni che codificano enzimi diidrotroato sintetasi (DHPS) o diidrofolato reductasi (DHFR) con bassa

affinità per questi antibatterici (Antonelli et al., 2017).



Classificazione della resistenza

La resistenza agli antimicrobici può essere classificata in:

1. **naturale o primaria o intrinseca**: si manifesta quando il batterio è costituzionalmente resistente ad un antibiotico (il batterio è privo dei bersagli cellulari su cui agisce l'antibiotico), è presente in tutti i ceppi appartenenti alla stessa specie;
2. **acquisita**: si verifica quando il batterio, sotto la pressione selettiva esercitata dal farmaco, modifica il proprio patrimonio

genetico affinché possa resistere all'antibiotico.

La resistenza acquisita può avvenire per:
a) induzione diretta: si verifica per adattamento fenotipico del microorganismo attraverso l'attivazione di enzimi precedentemente repressi;
b) mutazioni spontanee selezionate dall'antibiotico mediante una pressione selettiva;
c) trasporto di materiale genetico sia cromosomico (9) (ha una bassa frequenza di insorgenza, circa il 10%), sia extracromosomico (10) (ha un'alta frequenza di insorgenza, rappresentando circa il 90% delle resistenze) da un microorganismo all'altro, anche da una specie batterica all'altra. Si può attuare con meccanismi di coniugazione, trasformazione e trasduzione.

Tuttavia, accanto ai batteri che in un solo evento genetico acquisiscono la completa resistenza ad alcuni antibiotici, ne esistono altri che necessitano di più eventi successivi e mostrano un fenotipo cosiddetto “borderline”. Sono più difficili da individuare a causa della scarsa differenza tra la concentrazione di antibiotico necessaria per inibirne la crescita e quella che ne consente lo sviluppo.

In alcune situazioni i batteri manifestano un fenotipo non facilmente decifrabile a causa di alterazioni del tasso di crescita o di altre perturbazioni fisiologiche causate dalla mutazione che determina tale resistenza.

Il germe può celare la presenza di mutazioni che rappresentano già un’evoluzione verso l’insensibilità ma che può essere individuata solo con ulteriori prove mirate (esempio il caso dei ceppi produttori di b-lattamasi, enzima è in grado di idrolizzare - distruggere - l’anello b-lattamico dell’antibiotico annullando totalmente la sua attività antibatterica).

Cause della resistenza

Una delle principali cause del fenomeno della farmaco-resistenza è riconducibile all’utilizzo su vasta scala o abuso di antibiotici nell’uomo e negli animali che, accompagnato da cattive condizioni igienico-sanitarie, determina il rilascio di residui nell’ambiente che vanno a contaminare acqua, suolo e vegetazione (Marshall e Levy, 2011), rappresentando una minaccia globale, per le ampie ricadute sulla salute degli esseri umani e degli animali, nonché sull’ecosistema, espresso pienamente nel concetto “*One*

Health”, che riconosce lo stretto legame esistente tra uomo, animale e ambiente.

Sebbene tale termine sia stato introdotto per la prima volta nel 2004 durante un incontro della Wildlife Conservation Society, tenutosi a New York, dove fu proposto un approccio globale nella prevenzione delle zoonosi, per salvaguardare gli ecosistemi, il concetto di salute unica ha origini molto antiche. Infatti, già nel V secolo a.C., Ippocrate (460-370 a.C.) aveva compreso la stretta correlazione esistente tra ambiente, alimenti, abitudini di vita e patologie che, quindi non andavano affrontati separatamente, come compartimenti stagni, bensì come settori collegati e comunicanti (Evans e Leighton, 2014).

Ippocrate, considerato il padre della medicina moderna, superando la vecchia credenza dell’origine soprannaturale delle malattie, ipotizzò che avessero una causa naturale e riconoscibile. Egli paragonò l’organismo all’universo in miniatura - mantenuto in equilibrio dai quattro elementi basilari (acqua, terra, fuoco e aria) - dove, parimenti, gli stati di salute e malattia erano determinati dall’equilibrio delle quattro secrezioni visibili del corpo (sangue, flegma, bile gialla e bile nera).

La “teoria umorale” sostenuta da Ippocrate, che non prendeva in considerazione la possibilità del contagio, ha gettato le basi alla moderna microbiologia, mettendo in discussione i microrganismi quali vera causa di malattia (Antonelli et al., 2017).

Eppure, attualmente, anche grazie al progresso scientifico, si tende a pensare poco a questo concetto di salute unica e la scoperta degli antibiotici (ancor di più la loro produzione su vasta scala), che

sembrava segnare il nuovo futuro della medicina, risolvendo finalmente l'epilogo delle patologie provocate da batteri, a causa dell'uso scorretto di queste molecole, ha aperto l'orizzonte al preoccupante scenario della farmacoresistenza. A tal proposito, l'approccio "One Health" suggerisce "l'uso prudente" di antibiotici, sia in ambito umano sia in quello veterinario, principali settori responsabili del fenomeno della resistenza antimicrobica, con il rischio per l'intera popolazione di essere infettata da batteri resistenti (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; WHO, 2017). Tuttavia, nell'attribuzione di un ruolo nel determinismo dell'antibiotico-resistenza, l'attenzione non va focalizzata soltanto sui germi patogeni ma anche sui commensali, che rappresentano un serbatoio di ARG (geni di resistenza agli antibiotici), da cui i batteri patogeni possono acquisire resistenza attraverso la trasmissione di tipo orizzontale di materiale genetico (HGT).

Recenti studi hanno dimostrato che il trasferimento orizzontale di materiale genetico ha diffuso alcuni geni di resistenza agli antibiotici da specie commensali ed ambientali a specie patogene (Frieri, Kumar e Boutin, 2017). Inoltre, specialmente in ambito nosocomiale, sono stati individuati microorganismi che resistono a diverse classi di antibiotici, selezionando batteri multi-resistenti (MDR) (Serra-Burriel et al., 2020).

Questo uso generalizzato e inappropriato di antimicrobici, con conseguente aumento della resistenza - proporzionale al suo consumo (Bell et al., 2014) - recentemente sta assumendo dimensioni globali, interessando sia i paesi industrializzati sia quelli in via di

sviluppo, che non hanno armi per combattere le infezioni dovute a microrganismi divenuti resistenti.

Tale utilizzo di antimicrobici ha ormai coinvolto anche l'ambiente comunitario, per lungo tempo esente da queste problematiche, ma ove le segnalazioni di ceppi resistenti sono divenute sempre più frequenti (Livermore, 2003). Inoltre, investe vari settori della vita dell'essere umano, in quanto la sua diffusione è legata ad ambiente, cibo, animali domestici e non, commercio e fenomeni migratori, comportando seri risvolti economici e sociali, tanto da essere considerato una preoccupante emergenza sanitaria del terzo millennio (Holmes et al., 2016).

Spesso, in medicina umana e in medicina veterinaria -con particolare riferimento agli allevamenti di tipo intensivo- per poter iniziare immediatamente una terapia basata sull'individuazione dei sintomi, si ha la tendenza a somministrare molecole antimicrobiche ad ampio spettro (Frieri, Kumar e Boutin, 2017).

Le prescrizioni di tali farmaci, in assenza di antibiogramma o di esami di laboratorio microscopici e colturali che consentono l'isolamento dell'agente patogeno responsabile dell'infezione, rappresentano cause di impiego inappropriato degli antibiotici e si vanno a sommare alla diagnosi errata, all'utilizzo di farmaci inadatti a quel tipo di infezione, al dosaggio e/o alla durata insufficiente della terapia antibiotica, magari interrotta precocemente per remissione della sintomatologia clinica, all'assunzione diretta del farmaco, da parte dell'assistito senza consultare il medico curante, magari in quanto possiede già in casa l'antibiotico o



F. BELLINI, A. CAL, A. LIVERINI, G. PAGANI, S. ZACCHETTI

perché lo ha acquistato online (Jorgensen e Ferraro, 2009; Calza, 2013).

A tal proposito, l'Unione Europea ha, nel corso del tempo emanato linee guida e normative - Regolamento UE n. 6/2019, in materia di medicinali veterinari (11) - per scoraggiare l'utilizzo degli antibiotici negli animali di interesse zootecnico a scopo profilattico, per prevenire l'insorgenza di patologie o come promotori di crescita, consentendolo esclusivamente per fini terapeutici.

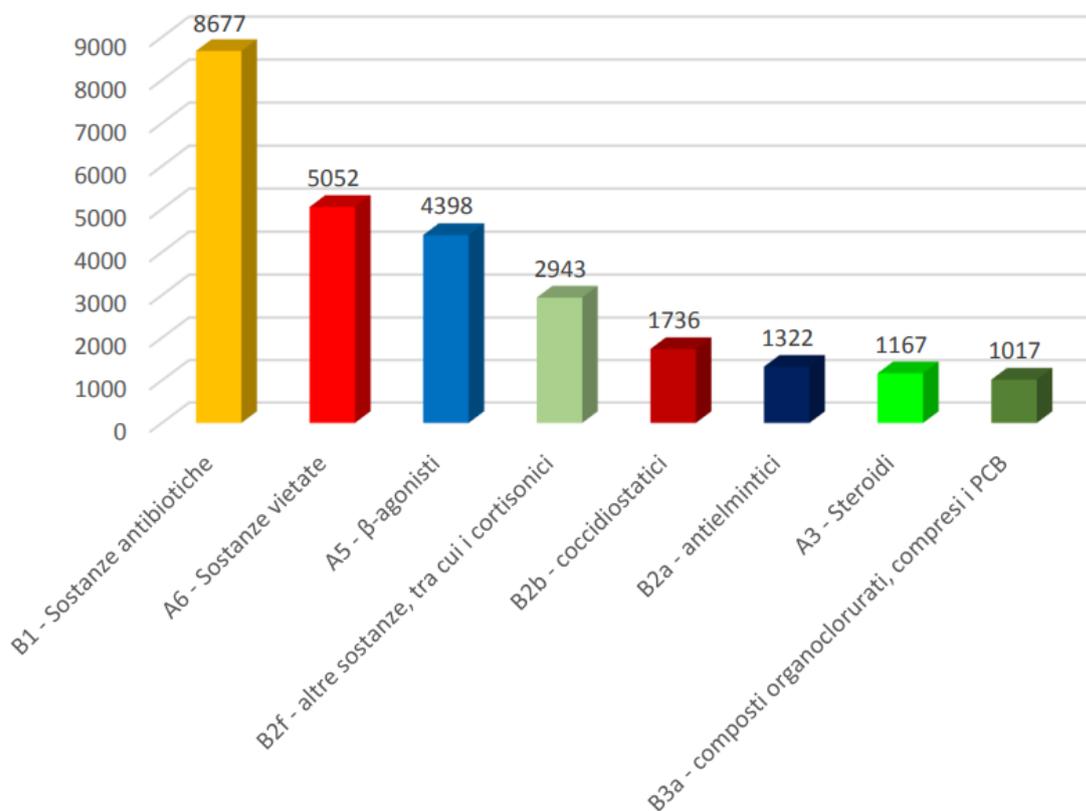
Inoltre, anche gli alimenti introdotti nell'Unione Europea, devono attenersi alle disposizioni contenute nella legislazione comunitaria, che stabiliscono i limiti massimi di residui di antibiotici in quelli di origine animale e annualmente l'EFSA (Autorità europea per la sicurezza alimentare) pubblica un rapporto in merito, che consente di avere il monitoraggio della situazione e, quindi, dell'esposizione dei consumatori ad essi.

Per verificare la presenza di tali residui, a tutela della popolazione, ogni anno, in

Italia, i veterinari ed i tecnici della prevenzione dei servizi veterinari delle singole Aziende Sanitarie Locali –ASL-, eseguono un numero prestabilito di campioni (prelevano porzioni di specifici organi direttamente al mattatoio, ma anche urina, latte, uova, miele, acqua di abbeveraggio e mangimi destinati agli animali negli allevamenti), stabilito da PNR e PNAA.

I campioni vengono inviati all'IZS, al fine dell'analisi tesa a svelare la presenza di sostanze proibite e la concentrazione massima di quelle permesse che viene fissata, in condizioni di precauzione, in riferimento a dosi che non hanno prodotto alcun sintomo avverso in fase preclinica e, pertanto, sono da ritenersi conformi in termini di sicurezza alimentare (SITOX Società Italiana di Tossicologia, 2019).

F. BELLINI, A. CAL, A. LIVERINI, G. PAGANI, S. ZACCHETTI



3

Numero di campioni su cui sono state ricercate le sostanze appartenenti ai gruppi indicati.

Tratto da PNR RELAZIONE CONTENENTE I RISULTATI DELL'ANNO 2020.

Ministero della Salute https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3107_allegato.pdf

§

3. LA STORIA DEGLI ANTIBIOTICI

La scoperta degli antibiotici risale al medico scozzese Alexander Fleming nel 1928 ma, in realtà, la storia degli antibiotici ha origini molto più antiche: infatti, già nell'antico Egitto sono state trovate tracce di tetracicline in ossa umane, risalenti agli anni 350-500 d. C., presumibilmente perché presenti in qualche alimento della dieta alimentare (Aminov, 2010).

Già verso la fine dell'800, Vincenzo Tiberio, ancor prima di terminare il suo corso di laurea in medicina, notò che ad Arzano, un paese in provincia di Napoli, ogni volta che il pozzo (che serviva per l'approvvigionamento dell'acqua potabile) veniva ripulito dalle muffe, chi beveva la sua acqua, presentava enterite che, invece, non si manifestava quando le muffe erano presenti sul bordo del pozzo. Tiberio pensò ad un legame di causa/effetto, e capì che le muffe contribuivano a rendere l'acqua potabile, ostacolando la crescita dei batteri patogeni e decise di analizzarle (Tamburello e Villone, 2017). Quindi raccolse dei campioni di acqua dal pozzo, li coltivò su terreni di coltura da lui preparati, li osservò al microscopio ed identificò tre specie di muffe presenti: *Aspergillus flavescens*, patogeno per l'uomo e per gli animali; *Penicillium glaucum* e *Mucor mucedo*, non patogeni. Successivamente Tiberio coltivò le muffe su terreni di coltura da lui preparati, che gli consentirono di studiare l'azione su

alcuni batteri, quali quello del tifo, del carbonchio, del colera e vari ceppi di stafilococco.

I risultati della ricerca gli permisero di osservare che le muffe esaminate presentavano azione battericida.

Lo studio, ripetuto parecchie volte, fu effettuato in vitro e confermato in vivo, attraverso la sperimentazione su cavie e conigli e consentì a Tiberio di preparare una sostanza con effetti antibiotici (Di Chiro, 2017). Per Tiberio, nel pozzo di Arzano si era verificato l'antibiosi o antagonismo biotico, fenomeno studiato dal biologo francese Paul Vuillemin, per indicare l'azione antagonista esistente tra microrganismi viventi, da cui derivò il termine di antibiotico (Tamburello e Villone, 2017). Il lavoro di Tiberio fu pubblicato nel gennaio del 1895, nella rivista "Annali d'Igiene sperimentale", con il titolo "Sugli estratti di alcune muffe": tuttavia, ciò che davvero mancò, all'epoca, fu la capacità di produrre il farmaco industrialmente (Vincenzo, 1895; Perciaccante et al., 2019). Inoltre, la scoperta di Vincenzo Tiberio avvenne in un periodo storico e culturale inadeguato ed immaturo per recepirne l'enorme rilevanza, che lasciava il suo lavoro scientifico chiuso all'interno di un laboratorio isolato, pubblicato soltanto in italiano, senza diffusione all'estero. Tutto ciò spiega il lungo silenzio della letteratura scientifica internazionale nei riguardi di questa grande scoperta (Di Chiro, 2017).



Figura 1. Vincenzo Tiberio
(<http://www.storiadellamedicina.net/wp-content/uploads/2018/03/Vincenzo-Tiberio-in-uniforme.jpg>)



Figura 2. Alexander Fleming
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Synthetic_Production_of_Penicillin_TR1468_crop.jpg

Alcuni anni dopo, nel 1910, il microbiologo Paul Ehrlich analizzò l'azione di alcuni composti dell'arsenico sul batterio *Treponema pallidum* ed introdusse una molecola, detta *Salvarsan* o *Arsfenamina* o *606*, (Zaffiri, Gardner e Toledo-Pereyra, 2012) efficace contro la sifilide, prima sperimentata su un modello animale e successivamente usata nell'uomo, dando così l'inizio all'era definita dallo stesso Ehrlich "chemioterapia" (Antonelli et al., 2017).

Nel 1928, Alexander Fleming, in modo casuale, notò che una sostanza prodotta naturalmente da un fungo, *Penicillium notatum*, aveva contaminato una delle sue colture batteriche, inibendo intorno a sé la loro crescita e chiamò questa sostanza **penicillina**.

Tuttavia, per iniziare la produzione del farmaco su vasta scala bisogna attendere il 1939, dopo l'incontro tra il biochimico tedesco Ernst Chain (scappato in Gran Bretagna per sfuggire al nazismo) e Howard Florey: gli studiosi riuscirono a isolare e purificare l'antimicrobico e a realizzare un metodo per amplificare la quantità di penicillina prodotta.

Successivamente, Mary Hunt iniziò ad utilizzare il *Penicillium chrysogenum*, in grado di produrre una quantità di principio attivo 200 volte superiore rispetto a quella ottenuta dal *Penicillium notatum* di Fleming.

Infine, con l'impiego dei raggi X, si riuscì a raggiungere una produzione mille volte più efficace della penicillina di Fleming, decretando l'origine di quella che è conosciuta come l'era degli antibiotici, che ha permesso la produzione della penicillina e la sintesi di molte altre molecole, anche simili, attive

F. BELLINI, A. CAL, A. LIVERINI, G. PAGANI, S. ZACCHETTI

nei confronti di differenti patologie (SITOX Società Italiana di Tossicologia, 2020).

Tuttavia, l'efficacia terapeutica della penicillina è stata messa in discussione già nel 1967, con l'insorgenza di ceppi penicillino-resistenti evidenziati in Papua Nuova Guinea (Hansman et al., 1974).

Da allora la resistenza alla penicillina è stata descritta in numerose parti del mondo e, particolarmente negli ultimi anni, si è registrato un forte incremento della resistenza a livello globale.

Ad aggravare la situazione è intervenuto il riscontro che, frequentemente, la penicillino-resistenza è accompagnata da resistenza anche ad altri antibiotici quali macrolidi, cotrimossazolo, tetracicline e cloramfenicolo.

Per meglio monitorare l'incidenza della resistenza che varia nelle diverse aree geografiche, sono stati utilizzati diversi sistemi di sorveglianza internazionali. Uno di questi è il Protekt (*Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin*), che ha avuto inizio nel 1999. I risultati di tale sistema hanno evidenziato per l'Italia, dal 2015 al 2018, un lieve calo nella percentuale di isolati di *S. pneumoniae* resistenti alla penicillina e all'eritromicina, mentre negli ultimi due anni si è riscontrata un'inversione di tendenza sia per la penicillina (dal 9,1% nel 2018 al 13,6% nel 2020) sia per l'eritromicina (dal 20,3% nel 2018 al 24,5% nel 2020) (Bellino et al., 2019).

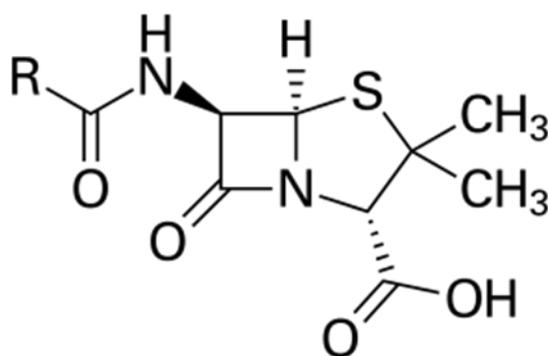


Figura 3 - Formula di struttura chimica della Penicillina

TABELLA

(fonte: “*Futuristic Non-antibiotic Therapies to Combat Antibiotic Resistance: A Review*”, 26 gennaio 2021) Copyright © 2021 Kumar, Sarma, Shubham, Kumawat, Verma, Nina, Devraj, Kumar, Singh and Tiwari

Panoramica dello sviluppo della resistenza batterica contro i comuni antibiotici.

Classe di antibiotici	Meccanismo di azione	Esempi di antibiotici	Anno introdotto o sul mercato	Anno di identificazione della resistenza agli antibiotici
Penicilline (β-lattame)	Inibizione della sintesi della parete cellulare batterica.	Penicillina	1943	1940,1965, 1967,1976 (Ventola, 2015)
		Ampicillina	1961	1962,1964 (Fischer e Ganellin, 2010; Steinhagen, 2011)
		Amoxicillina	1972	1977 (Fischer e Ganellin, 2010; Roy, 2011)
		Meticillina	1960	1960 (Jevons, 1961)
Cefalosporine (β-lattame)		Cefotaxima	1980	1983 (Knothe <i>et al.</i> , 1983)
		Ceftarolina	2010	2011 (FDA, 2010; CDC, 2013)
		Ceftazidime (cefalosporine di terza generazione)	1984	1987 (Burwen, Banerjee e Gaynes, 1994; Fischer e Ganellin, 2010; Humphries <i>et al.</i> , 2015)
		Ceftazidima-avibactam	2015	2015 (FDA, 2015; Humphries <i>et al.</i> , 2015)
Aminoglicosidi	Inibizione della biosintesi proteica	Streptomina	1944	1946 (Youmans e Williston, 1946; Crofton e Mitchison, 1948; Schatz, Bugie e Waksman, 2005)
		Tobramicina	1967	1981 (Fischer e Ganellin, 2010)
		Amikacina	1976	1981 (Bongaerts e Kaptijn, 1981; John <i>et al.</i> , 1982; Levine <i>et al.</i> , 1985)
		Gentamicina	1963	1973 (Greene <i>et al.</i> , 1973; Fischer e Ganellin, 2010)
		Neomicina	1952	1950 (WAISBREN e SPINK, 1950; Fischer e Ganellin, 2010)
		Kanamicina	1957	1967 (UMEZAWA <i>et al.</i> , 1957)
cloramfenicolo		cloramfenicolo	1948	1960 (Smith e Worrel, 1949; Fischer e Ganellin, 2010; Lewis, 2013)
Glicopeptidi	Inibizione della sintesi della parete cellulare	Vancomicina	1972	1988 (Anderson, Higgins Jr e Pettinga, 1961; Leclercq <i>et al.</i> , 1988; Uttley, 1988; Frost, Steketee e Williams, 2000; Murray, 2000; Depardieu <i>et al.</i> , 2003; Sievert <i>et al.</i> , 2008)
		Teicoplanina (derivato della vancomicina)	1984	1986 (Johnson <i>et al.</i> , 1990; Butler <i>et al.</i> , 2014)
Ansamicine	Inibizione della sintesi dell'RNA	Rifampicina	1968	1972 (Tsukamura, 1972; Sensi, 1983; Telenti <i>et al.</i> , 1993; Lesch, 2007)
Sulfamidici	Inibizione della sintesi del DNA	Prontosil	1936, 1935	1942 (Lesch, 2007)

		Sulfametossazolo	1961	1960 (Akiba <i>et al.</i> , 1960; Stamm e Hooton, 1993; Andrew, 2006)
tetracicline	Inibizione della biosintesi proteica	tetraciclina	1950	1959 (Ramsey e Edwards, 1961; Fischer e Ganellin, 2010)
Macrolide		Eritromicina	1953	1956 (Jones, Nichols e Finland, 1956)
		Azitromicina	1980	2011 (Soge <i>et al.</i> , 2012)
ossazolidinoni		Linezolid	2000	2001 (Tsiodras <i>et al.</i> , 2001; Li e Corey, 2013; Török, Moran e Cooke, 2017)
Chinoloni	Inibizione della sintesi del DNA	Ciprofloxacina	1987	2007 (Castanheira <i>et al.</i> , 2007)
		Levofloxacina	1996	1996 (CDC, 2013)
Lipopeptidi	Interruzione della sintesi della parete cellulare che interrompe molteplici aspetti della funzione della membrana cellulare batterica	Daptomicina	2003	2004 (Mangili <i>et al.</i> , 2005)
		bacitracina	1945	1955 (Weinberg e Tonnis, 1967; Pearl. Mary C, 2007)
		Aztreonam	1984, 1986	1986 (Res, Hoti e Charrois, 2017)
		Imipene	1985	1996 (Troillet, Samore e Carmeli, 1997; Fischer e Ganellin, 2010)
Lincosamidi	Interferire con la sintesi delle proteine	Clindamicina	1966	1971 (Watanakunakorn, 1976; Troillet, Samore e Carmeli, 1997)

§

4. LA CHIMICA DEGLI ANTIBIOTICI

Gli antibiotici sono formati da molecole organiche, ossia composti chimici in cui sono presenti principalmente atomi di carbonio e idrogeno, ed eventualmente ossigeno, azoto, zolfo.

A livello industriale vengono prodotti mediante fermentazione, ma esistono anche antibiotici sintetici (es. i sulfamidici).

Lo studio che porta alla scoperta di nuove molecole è molto lungo, complesso e costoso. Infatti, esistono tanti microrganismi, non ancora conosciuti, in grado di sviluppare

patologie o magari capaci di produrre molecole antibiotiche.

Tuttavia, la sperimentazione richiede ingenti investimenti economici e temporali, anche perché va verificata l'eventuale tossicità nei confronti dell'uomo.

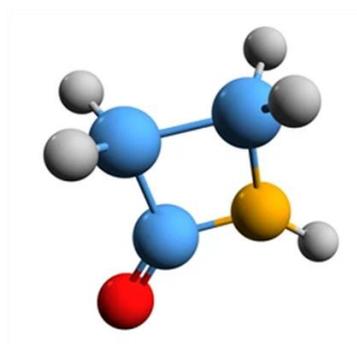
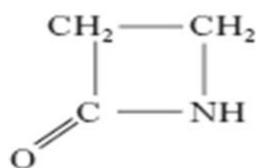
Lo sviluppo dei metodi computazionali ha dato un notevole input alla ricerca negli ultimi anni: le tecniche di simulazione aiutano e guidano gli studiosi verso la scoperta di nuovi farmaci.

Il primo antibiotico utilizzato in terapia è la penicillina G che ha, nella sua struttura, un anello β -lattamico.

Il β -lattame è un anello a 4 atomi che forma un'ammide ciclica (lattame), che costituisce il nucleo funzionale principale della classe di antibiotici detti β -lattamici (Bush e Bradford, 2016). Tale anello ha

una somiglianza strutturale con il dipeptide d-Ala-d-Ala, con il quale compete per gli enzimi transpeptidasi, responsabili della formazione dei legami crociati tra le catene del peptidoglicano. L'anello β -lattamico espleta un'azione battericida, legando covalentemente l'enzima penicillin-binding proteins (PBP) ed inattivandolo in modo

irreversibile. L'anello β -lattamico può essere incluso in diversi tipi di strutture chimiche per ottenere un gran numero di farmaci che si differenziano tra di loro per spettro di attività antibatterica e/o caratteristiche farmacocinetiche (Antonelli et al., 2017).



Anello β -lattamico

§

5. CLASSIFICAZIONE DEGLI ANTIBIOTICI

Di seguito si riportano le differenti classificazioni degli antibiotici.

A. Gli antibiotici possono essere classificati in “*famiglie*”, ovvero molecole che presentano caratteristiche simili (es. le penicilline).

B. Un'altra classificazione riguarda lo “*spettro d'azione*”, ovvero le specie batteriche verso le quali un antibiotico presenta attività. Si definisce ampio se la molecola è attiva verso batteri Gram

positivi e Gram negativi; medio, se la molecola è attiva, ad esempio, verso batteri Gram positivi e verso alcuni Gram negativi; ristretto se la molecola è attiva, ad esempio, solamente verso batteri Gram positivi o solamente verso batteri Gram negativi

C. Il “*tipo d'azione*” indica l'attività che esercita l'antibiotico: può essere: batteriostatica, se inibisce la riproduzione dei batteri; battericida, se uccide i batteri, determinando, dopo 24 h di contatto in vitro, una sopravvivenza uguale o inferiore allo 0,01%.

Il tipo di azione di un antibiotico dipende dal suo meccanismo d'azione.

Per valutare se un antibiotico è batteriostatico o battericida si considerano la **MIC**, che rappresenta la

minima concentrazione di antibiotico in grado di inibire lo sviluppo dei microrganismi ($\mu\text{g/ml}$), e la **MBC**, ossia la minima concentrazione di antibiotico in grado di portare a morte le cellule batteriche ($\mu\text{g/ml}$).

Se l'antibiotico è battericida i valori di MIC e MBC coincidono.

Se l'antibiotico è batteriostatico i valori di MIC e MBC sono differenti ($\text{MBC} > \text{MIC}$).

D. Gli antibiotici possono essere classificati in base "*all'origine*". Questa può essere: estrattiva, se si ottengono da batteri e funghi (Penicillium, Cephalosporium, Streptomyces); semisintetica, se ad una struttura base ottenuta per estrazione (fermentazione) si aggiungono catene di sintesi; o sintetica (chinolonici, monobattamici, cloramfenicolo);

E. Un'altra classificazione è rappresentata dalla "carica elettrica": gli antibiotici a carattere acido si comportano come anioni (penicilline, cefalosporine, chinoloni); quelli che hanno carattere basico si comportano come cationi (aminoglicosidi, macrolidi) e quelli a carattere neutro si comportano come molecole non ionizzate (cloramfenicolo). Il grado di ionizzazione degli antibiotici è influenzato dal pH e condiziona l'assorbimento e l'eliminazione.

F. Gli antibiotici vengono classificati in base al "*meccanismo d'azione*", che indica le loro proprietà farmacodinamiche:

i) Gli antibiotici possono inibire la sintesi della parete cellulare. Tale inibizione si può verificare nella fase terminale o di transpeptidazione

(penicilline, cefalosporine), nella seconda fase, ossia nel trasferimento e polimerizzazione del mucopeptide parietale (vancomicina), oppure nella prima fase di sintesi (fosfomicina, cicloserina).

ii) Possono alterare la funzione della membrana plasmatica batterica, come i composti ad azione detergente (polimixine) ed i composti che causano una rapida depolarizzazione con perdita del potenziale di membrana (lipopetidi).

iii) L'azione degli antimicrobici può manifestarsi con l'inibizione della sintesi proteica. Può avvenire a livello della sub unità 30S dei ribosomi (aminoglicosidi, tetracicline) oppure a livello della sub unità 50S dei ribosomi (cloramfenicolo, macrolidi, clindamicina, streptogramine, linezolid: oxazolinidioni).

iv) Gli antibiotici possono inibire il meccanismo di replicazione e di trascrizione degli acidi nucleici: inibendo la RNA-polimerasi DNA-dipendente batterica (rifamicine) oppure inibendo la DNA-girasi (fluorochinoloni).

v) Possono anche agire da antimetaboliti e bloccare enzimi essenziali del metabolismo batterico (sulfamidici, trimethoprim).

In passato, in ambito zootecnico, è stato fatto un largo uso di antimicrobici come promotori di crescita, per favorire l'incremento ponderale degli animali, pratica oggi vietata dalla Legislazione Comunitaria.

Attualmente gli antibiotici vengono somministrati a scopo terapeutico, scegliendo possibilmente una molecola mirata, confortata da test diagnostici specifici, per curare animali con patologie.

Gli antibiotici sono stati largamente somministrati anche a scopo profilattico, nel caso in cui animali da reddito siano venuti a contatto con soggetti infetti e, quindi, potrebbero essere stati infettati anche loro, ancorché asintomatici.

Infine, sono stati utilizzati per prevenire le infezioni ad animali sani sottoposti a stress (Aarestrup, 2015).

§

6. USO DEGLI ANTIBIOTICI IN ZOOTECCIA

Nel 1948, il biochimico Thomas H. Jukes, ha effettuato uno studio sugli effetti della vitamina B12 nei polli ed ha notato che i mangimi fermentati da *Streptomyces aureofaciens* determinavano un incremento ponderale ed un ridotto tasso di mortalità nei soggetti a cui venivano somministrati (Stokstad e Jukes, 1951)

La diffusione degli effetti degli antibiotici negli animali decretò un largo impiego di mangimi medicati negli allevamenti, in particolare in quelli suinicoli, avicoli e di bovini.

Ciò permise di calmierare i prezzi della carne, con conseguente aumento del suo consumo.

In Europa fu autorizzata la somministrazione di antibiotici come promotori della crescita, senza bisogno della prescrizione medico-veterinaria.

Negli anni Cinquanta, mentre in zootecnia si diffondeva l'uso dei mangimi medicati ed aumentava il consumo della carne, parallelamente la popolazione cominciava a domandarsi se gli alimenti di origine animale avessero

potuto contenere dei residui di antibiotici.

La Food and Drug Administration (FDA) volle valutare l'eventuale presenza di antibiotici nel latte e nei prodotti lattiero-caseari e trovò una positività superiore al 5% nei confronti degli antimicrobici.

Da allora la FDA ritenne necessario il monitoraggio dei residui di antibiotici nel latte.

Il governo britannico definì rischiosa la somministrazione di antimicrobici come promotori di crescita per gli animali ma anche per l'uomo, in quanto favorisce la comparsa di resistenza antimicrobica ed introdusse delle restrizioni per l'uso di antibiotici nel settore zootecnico.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità si rese conto della necessità di contenere il fenomeno della resistenza antimicrobica, obiettivo raggiungibile riducendo in zootecnia l'uso eccessivo di antimicrobici, vietandone l'uso come promotori della crescita e rafforzando i sistemi di sorveglianza del loro consumo. Svezia e Norvegia furono i primi paesi a adottare politiche volte alla riduzione dell'uso di antibiotici negli allevamenti.

In seguito, anche la Danimarca interruppe l'uso degli antimicrobici come promotori della crescita negli allevamenti di polli e suini, registrando, pochi anni dopo la sua introduzione, una significativa diminuzione della resistenza antimicrobica in tali allevamenti del paese.

Nel 2006, a seguito dell'entrata in vigore il Regolamento CE 1831/2003 (12), il Legislatore comunitario sancisce il divieto dell'uso degli antibiotici come promotori della crescita animale nell'Unione Europea.

Gli Stati Uniti, invece, continuarono ad aggiungere promotori di crescita a dosi sub-terapeutiche all'interno dei mangimi

e nell'acqua di abbeveraggio fino al 2017, anno in cui tale impiego è stato vietato.

§

7. TRASFERIMENTO ORIZZONTALE DEI FATTORI DI RESISTENZA

Il trasferimento genico orizzontale consente la diffusione di geni di resistenza, rendendoli disponibili a una popolazione molto più ampia della comunità batterica, spesso oltre i confini di specie (Martínez, 2012).

Per quanto riguarda la mobilitazione dei fattori di resistenza, il trasferimento di geni tra batteri, in teoria, può verificarsi ovunque.

Tuttavia, affinché i geni di resistenza vengano trasferiti orizzontalmente da batteri ambientali a batteri patogeni, questi devono, almeno temporaneamente, condividere lo stesso habitat (Matte-Tailliez et al., 2002; Wiedenbeck e Cohan, 2011) ed è molto più probabile che ciò avvenga tra batteri filogeneticamente strettamente correlati (Philippot et al., 2010; Smillie et al., 2011).

Inoltre, il trasferimento di materiale genetico tra le cellule batteriche è indotto da fattori stressanti come antibiotici (Hastings, Rosenberg e Slack, 2004; Jutkina et al., 2016) ma anche metalli e biocidi (13) (Seier-Petersen et al., 2014; Zhang et al., 2017).

Pertanto, ci si potrebbe aspettare che il trasferimento di resistenza ai patogeni sia relativamente frequente tra i batteri associati all'uomo (Salyers, Gupta e Wang, 2004), in particolare durante la

somministrazione di una terapia antibiotica.

Al contrario, il trasferimento di geni di resistenza ai patogeni provenienti da batteri ambientali, che occupano altri habitat e spesso sono meno correlati filogeneticamente, sarebbe probabilmente meno comune, sebbene i fattori di stress ambientali possano indurre il trasferimento genico orizzontale da e verso patogeni umani. Ciò significa che una volta che un fattore di resistenza è trasferito in un patogeno umano, è più probabile che si diffonda ulteriormente tra commensali e patogeni, piuttosto che venga trasferito nuovamente in un altro patogeno da batteri ambientali (Bengtsson-Palme e Larsson, 2015).

Inoltre, è pressoché impossibile evitare il trasferimento di resistenza tra agenti, poiché condividono habitat e spesso sono filogeneticamente correlati (Andersson e Hughes, 2010).

Sorprendentemente, il microbioma umano (14) ospita un numero abbastanza elevato di geni di resistenza che, per ragioni sconosciute, non sono ancora stati trasferiti ai patogeni umani (Sommer, Dantas e Church, 2009; Sommer, Church e Dantas, 2010), ma si può ipotizzare che siano in gioco forti barriere che si oppongono al loro trasferimento. Ad esempio, molti dei geni di resistenza nei batteri coltivabili dell'intestino umano derivano da organismi aerobi e sono identici ai geni di resistenza nei patogeni umani. Invece, la porzione non coltivabile del microbioma umano, che corrisponde per lo più a organismi anaerobi, contiene frazioni molto più elevate di geni precedentemente sconosciuti e conferisce resistenza ad aminoglicosidi, amfenicoli,

beta-lattamici e tetracicline (Sommer, Dantas e Church, 2009).

Pertanto, si può ipotizzare che le differenze nella preferenza dell'ossigeno possano rappresentare una barriera al trasferimento della resistenza e che (Martínez, 2012) è improbabile che la grande maggioranza dei fattori di resistenza che esiste si incontri nei patogeni e nei commensali umani, ma ci si aspetterebbe invece che sia presente nei batteri ambientali (Allen et al., 2010). I batteri non tipicamente associati al microbioma umano possono avere l'opportunità di interagire con specie associate all'uomo in vari contesti.

È possibile che i batteri ambientali possano essere presenti transitoriamente nel microbioma umano, ad esempio dopo l'interazione con animali selvatici, l'assunzione di cibo crudo o il consumo di acqua contaminata (Allen et al., 2010; de Boeck et al., 2012; Ghaly et al., 2017).

L'impatto di questi fattori di esposizione è incerto, in quanto i tempi di interazione sono limitati e non si conoscono gli elementi che scatenano il trasferimento dei geni di resistenza nei batteri ambientali con questo tipo di eventi stressanti.

Inoltre, ci sono anche altri contesti in cui i batteri umani possono interfacciarsi con quelli associati agli animali e all'ambiente.

Va tenuta in considerazione la lunghezza del percorso di dispersione da quelli ambientali alla popolazione umana (Baquero, Martínez e Cantón, 2008).

Un agente patogeno (o commensale) che acquisisce un nuovo fattore di resistenza da un batterio ambientale ma viene eliminato prima che possa tornare a un ospite umano, non causa mai problemi di resistenza clinica. Solo quelli che tornano

dai loro ospiti possono costituire vere minacce per la salute umana.

Strutture come gli impianti di trattamento delle acque reflue (STP) forniscono un ambiente che offre opportunità di interazione per una gamma di diverse specie batteriche e possono anche rappresentare condizioni sufficienti per la selezione della resistenza (Rizzo et al., 2013).

Altri ambienti che potrebbero fungere da terreno fertile per il trasferimento della resistenza, si possono trovare in agricoltura, in particolare tra il bestiame (Allen, 2014; Bengtsson-Palme, 2017), i corpi idrici (Baquero, Martínez e Cantón, 2008; Dingemans e Wolf, 2010; Lupo, Coyne e Berendonk, 2012) e la filiera alimentare (Rolain, 2013; Bengtsson-Palme, 2017). Tutti questi ambienti hanno come fattore comune la brevità delle vie di esposizione all'uomo dopo un potenziale evento di trasferimento.

Infine, è possibile il trasferimento di fattori di resistenza da agenti patogeni umani a batteri ambientali, consentendo ai batteri associati all'uomo di utilizzare popolazioni batteriche ambientali come serbatoi per geni di resistenza che, successivamente, possono essere reclutati nuovamente nel resistoma (15) associato all'uomo (Baquero, Martínez e Cantón, 2008).

Diversi studi dimostrano il trasferimento di geni di resistenza tra diversi microorganismi come *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e ceppi di *Bacteroides* (Shoemaker et al., 2001).

Patogeni opportunisti che di solito prosperano nel suolo, come *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum intermedium* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Berg et al., 2013; Johnning et al., 2013), possono fungere da ricettori di geni di resistenza a

batteri associati all'uomo e, in un secondo momento, potrebbero trasferire tali geni o addirittura infettare gli stessi esseri umani. Sebbene questo processo non sia ben quantificabile, i geni di resistenza che circolano tra i patogeni sono di difficile eliminazione.

I fattori di resistenza possono quindi "riemergere" senza essere nuovamente reclutati dai batteri ambientali, non patogeni.

L'ambiente, quindi, come deposito o serbatoio di geni di resistenza comunemente incontrati nei patogeni è probabilmente meno preoccupante dell'ambiente inteso come fonte di nuovi fattori di resistenza nei patogeni o del suo ruolo di disseminazione di patogeni resistenti.

Inoltre, le misure per prevenire il reclutamento di nuovi geni di resistenza dall'ambiente, potrebbero sovrapporsi alle strategie di mitigazione per evitare la diffusione di nuovi fattori di resistenza nei patogeni.

§

8. MECCANISMO DI DIFFUSIONE DEI BATTERI RESISTENTI

Per gli esseri umani la principale via di esposizione ai patogeni resistenti è rappresentata dalle altre persone e si può verificare attraverso l'ambiente nosocomiale (attraverso la contaminazione di mani, guanti e camici) o quello esterno.

L'esposizione avviene mediante il contatto diretto oppure indiretto (droplets, condivisione di superfici contaminate o cibo preparato da persone che trasportano l'agente patogeno) (Livermore, 2000).

Le persone costituiscono le vie di trasmissione e diffusione degli agenti infettivi in generale e gli interventi per prevenire la circolazione di patogeni resistenti tra gli esseri umani sono sovrapponibili a quelli applicati per evitare la diffusione di qualsiasi batterio patogeno (Levin, Baquero e Johnsen, 2014).

Sicuramente le buone prassi igienico-sanitarie costituiscono la principale barriera che si oppone alla propagazione e all'ingresso dei patogeni resistenti (Mattner et al., 2012).

È stato riconosciuto anche all'ambiente un ruolo fondamentale come via di diffusione di germi resistenti (Allen et al., 2010; Bengtsson-Palme, Jonsson e Heß, 2021) che può facilitare la diffusione di agenti patogeni umani non resistenti e di patogeni opportunisti.

Gli impianti di trattamento delle acque reflue, i corpi idrici, i viaggi, l'aria, la polvere ed il cibo colonizzato da batteri, rappresentano vettori che consentono la trasmissione batterica tra gli ospiti attraverso l'ambiente (Pal et al., 2016; Bengtsson-Palme, 2017).

Gli impianti di trattamento delle acque reflue generalmente scaricano il loro effluente -che ha ripetutamente dimostrato di contenere geni di resistenza- nei corpi idrici (Bengtsson-Palme et al., 2016).

L'acqua contaminata viene spesso utilizzata per irrigare i terreni agricoli e, dopo un ulteriore trattamento, come approvvigionamento di acqua potabile.

Gli animali domestici spesso bevono l'acqua di superficie non trattata e successivamente possono diffondere batteri resistenti agli esseri umani.

Tuttavia, per la diffusione di batteri resistenti, le acque reflue non trattate

confluite nei corpi idrici rappresentano un rischio considerevolmente maggiore rispetto agli effluenti degli impianti di trattamento, poiché tali impianti spesso riducono il numero totale dei batteri e quello dei geni di resistenza (Bengtsson-Palme et al., 2016; Karkman et al., 2016; Bell et al., 2021).

Per limitare la diffusione dei batteri associati all'uomo, resistenti o meno, è necessario riuscire a comprendere le barriere rilevanti alla loro dispersione e, contrariamente al caso dei batteri trasmessi in ambiente nosocomiale, è considerevolmente più difficile identificarle nell'ambiente esterno.

Una certa comprensione di come sopravvivono diversi agenti patogeni nell'ambiente esterno può essere acquisita dall'epidemiologia, sebbene questo sia un argomento particolarmente studiato soltanto per alcuni batteri modello.

È importante sottolineare che le barriere di dispersione sono in gran parte specie-specifiche, poiché batteri diversi hanno requisiti molto diversi per la sopravvivenza al di fuori del loro habitat d'elezione. Ad esempio, molti batteri intestinali sono anaerobi obbligati e, quindi, mostrano una scarsa sopravvivenza - e di conseguenza anche una capacità di dispersione limitata - al di fuori del corpo umano.

Poiché nella diffusione di batteri associati all'uomo (resistenti o meno) attraverso l'ambiente, è fondamentale la sopravvivenza, più della crescita, è probabile che il vantaggio di trasportare geni di resistenza in presenza di basse concentrazioni di antibiotici sia minimo o trascurabile per le specie che utilizzano solo l'ambiente come matrice di dispersione.

D'altra parte, per i batteri che utilizzano l'ambiente come habitat alternativo o principale (e quindi possono facilmente crescervi) è molto più probabile che un'eventuale esposizione agli antibiotici contribuisca alla selezione dei fattori di resistenza durante la disseminazione ambientale. A questa categoria appartengono patogeni opportunisti ed emergenti, come *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus cereus* (Berg, Eberl e Hartmann, 2005). Ciò significa che i fattori che influenzano la selezione dei ceppi resistenti durante la dispersione ambientale sono specie-specifici, come la capacità di formare stadi dormienti inattivi, ad esempio le spore di *Bacillus anthracis*, altamente resilienti (Leggett et al., 2012).

Le fasi di vita dormienti potrebbero aiutare enormemente i batteri a sopravvivere nella matrice di dispersione, e a rigenerarsi una volta venute a contatto con un ospite adatto (Lennon e Jones, 2011).

Tuttavia, le vie di dispersione dei batteri nell'ambiente non sono state completamente eluse.

La ricerca volta a identificare la tracciabilità delle fonti microbiche e i rischi per la salute associati, ad esempio, alla dispersione di acque reflue non trattate, ha permesso di conoscere la persistenza e il potenziale di reinfezione di alcuni batteri intestinali dell'uomo nell'ambiente (Harwood et al., 2014).

Inoltre come è noto dalla fisica, forze come il movimento del vento e dell'acqua, possono diffondere i batteri in grandi distanze (Allen et al., 2010).

Varie specie di batteri sono state isolate dall'aria, come *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Aeromonas* (Gorny e Dutkiewicz, 2002; Tsai e Macher, 2005; Mosalaei et al., 2021).

Recentemente, è stata riconosciuta anche l'aria quale potenziale via di sopravvivenza e dispersione di batteri resistenti (Zhang et al., 2019) ma, a causa della sua assenza di apporto di nutrienti, la capacità di crescere in presenza di antibiotici diventa un fattore quasi trascurabile. Pertanto, il trasferimento dell'aria consentirebbe la diffusione di batteri sia resistenti sia non resistenti e, sebbene sia possibile il trasferimento orizzontale di resistenza tra batteri negli aerosol e nelle particelle di pulviscolo, è meno probabile che tali eventi si stabiliscano permanentemente nei genomi riceventi, a meno che, successivamente, questi vengano esposti agli antibiotici in un ambiente che ne consenta la crescita.

È noto anche che uccelli ed animali selvatici che vivono vicino all'uomo, ospitano batteri portatori di geni di resistenza e possano contribuire alla diffusione di tali geni in vaste aree (Bonnedahl et al., 2009; Wheeler et al., 2012; Bell et al., 2021; Plaza-Rodríguez et al., 2021; Worsley-Tonks et al., 2021; Zeballos-Gross et al., 2021).

Inoltre, è stato dimostrato che il commercio alimentare globale trasporta batteri patogeni resistenti in tutto il mondo, contribuendo all'insorgenza di epidemie, quale, ad esempio, quella tedesca nel 2011 di *Escherichia coli* (O104:H4), che ha prodotto la tossina Shiga (Rasko et al., 2011).

Tuttavia, resta ancora molto da studiare per comprendere i limiti di dispersione, la sopravvivenza ambientale, la competitività, la selezione della resistenza e gli habitat alternativi dei batteri associati all'uomo nell'ambiente (Hiltunen, Virta e Anna-Liisa, 2017).

Ancora meno si sa come i batteri ambientali non patogeni e portatori di

resistenza si disperdano e interagiscano con i batteri associati all'uomo. In questo processo, i patogeni opportunisti che hanno l'ambiente come habitat principale, possono svolgere un ruolo molto importante nel mediare la resistenza dei batteri ambientali al microbioma umano.

Meritano uno studio approfondito i fattori che determinano la sopravvivenza dei batteri ambientali nelle varie matrici di dispersione, come anche le vie di disseminazione ambientali, la mobilitazione e il mantenimento dei geni di resistenza, fino all'uomo e agli animali, oggi ancora poco conosciuti.

Occorre anche focalizzare l'attenzione sul monitoraggio della presenza di agenti patogeni e geni di resistenza in una varietà di contesti ambientali.

§

9. PROCESSI EVOLUTIVI CHE INFLUENZANO LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI AMBIENTALI

Per il mantenimento a lungo termine dei geni di resistenza agli antibiotici nelle comunità batteriche, entrano in gioco due forze evolutive parallele: la selezione che promuove i fenotipi di resistenza e la selezione che porta alla riduzione del "fitness cost" (16) associato al trasporto dei geni di resistenza (Andersson e Hughes, 2010; Hernando-Amado et al., 2017, 2020).

L'acquisizione e l'insediamento dei geni di resistenza in una popolazione batterica dipendono in gran parte da una pressione selettiva diretta degli antibiotici (Martinez, 2014) ma possono anche essere favoriti dalla co-selezione da parte di altre sostanze presenti, come metalli

(Wales e Davies, 2015; Cheng et al., 2019).

Allo stesso modo, l'esposizione ad altri fattori di stress rispetto agli antibiotici può selezionare geni che codificano per le pompe di efflusso, che a loro volta possono rendere i batteri meno suscettibili anche agli antibiotici. Ciò potrebbe favorire lo sviluppo e l'evoluzione di geni di resistenza efficienti, consentendo ai batteri di resistere ad un'esposizione agli antibiotici a basso dosaggio per tempi più lunghi.

Perdite casuali di geni di resistenza dalle cellule batteriche si verificano continuamente, ma raramente portano alla completa eliminazione del gene dalla popolazione, il che significa che una volta che riemerge una pressione selettiva per la resistenza (come durante una terapia antibiotica), il suo sviluppo nei batteri precedentemente sottoposti a selezione può essere veloce (Levin et al., 1997).

La pressione selettiva che agisce in modo specifico contro il trasporto di geni di resistenza è quindi cruciale per l'eradicazione completa dei fattori di resistenza da una comunità.

Il *fitness cost* associato al trasporto e all'espressione di geni che determinano resistenza agli antibiotici è dovuto in gran parte alla natura del meccanismo di resistenza.

I batteri in genere diventano resistenti agli antibiotici tramite: la sovraregolazione delle pompe di efflusso che esportano la sostanza dalla cellula; le modifiche alla parete cellulare o alla membrana esterna, che riducono la permeabilità per la sostanza antibiotica; l'espressione di enzimi di degradazione che possono rendere la sostanza innocua; la protezione del bersaglio molecolare

dell'antibiotico (Arzanlou, Chai e Venter, 2017).

I meccanismi di resistenza associati alle pompe di efflusso e alle modifiche della parete cellulare sono spesso causati da mutazioni del DNA cromosomico, sebbene molte pompe di efflusso siano trasferibili sui plasmidi.

È più probabile che gli enzimi di degradazione, le proteine di protezione del bersaglio e gli enzimi che consentono l'utilizzo di percorsi enzimatici alternativi siano trasmissibili su elementi genetici mobili poiché aggiungono funzioni al loro vettore piuttosto che modificare quelle esistenti.

Sotto la selezione degli antibiotici, l'evoluzione di una popolazione batterica verso la resistenza dipende sia dalla dimensione della popolazione sia dal tasso di mutazione (Perron et al., 2015).

Alcune mutazioni hanno un *fitness cost* basso o nullo, ma sembra esserci la tendenza che queste conferiscano anche un grado di resistenza inferiore rispetto a mutazioni più costose, almeno per alcuni antibiotici (Melnyk, Wong e Kassen, 2015).

Le relazioni tra *fitness cost* e grado di resistenza non sono ancora state chiarite per i geni di resistenza mobile.

Una recente meta-analisi (17) del *fitness cost* associato a diversi tipi di fattori di resistenza suggerisce che il mantenimento dei plasmidi di resistenza comporta un costo inferiore rispetto al costo della resistenza causata da mutazioni cromosomiche (Vogwill e Maclean, 2015).

Pertanto, la maggior parte dei geni di resistenza trasferiti orizzontalmente può effettivamente presentare un costo ridotto per i loro ospiti. In tal caso, il vantaggio di perdere un gene di resistenza mobile sarebbe piccolo per la singola cellula e

rientrerebbe nel, meccanismo della casualità.

Perdite casuali, tuttavia, spesso non saranno sufficienti per eradicare completamente i geni di resistenza da una popolazione (Levin et al., 1997).

Considerando che la maggior parte degli antibiotici in uso deriva da composti naturali, prodotti da microrganismi nell'ambiente, la presenza di geni che conferiscono resistenza a tali composti in una vasta gamma di habitat non sorprende (Pal et al., 2016).

Molto probabilmente i geni di resistenza non si sono evoluti per combattere le alte concentrazioni di antibiotici utilizzati in terapia, poiché è improbabile che si trovino concentrazioni così elevate in ambienti con impatto antropico nullo o ridotto (Kümmerer, 2009).

Molti antibiotici, a basse concentrazioni, sembrano sovraregolare le pompe di efflusso, aumentare i tassi di mutazione e mobilitare il DNA (Blázquez et al., 2012).

Le ragioni esatte di ciò rimangono poco chiare ma sembra che la sovraregolazione delle pompe di efflusso contribuisca a una migliore adattabilità ai cambiamenti ambientali.

Pertanto, quando le risorse nell'habitat iniziano a scemare, il rilascio di antibiotici avvia la generazione di variabilità genetica, che può favorire la ricerca di nuove nicchie e habitat adatti.

Questo fattore garantirebbe un utilizzo più efficiente delle risorse. In questo caso, i geni di resistenza potrebbero essersi evoluti per bilanciare queste esigenze o per prevenire il salto di specie.

Ciò implica che potrebbe essere vantaggioso trasportare geni di resistenza indipendentemente dalla selezione di antibiotici antropogenici.

Allo stesso modo, le mutazioni di resistenza possono anche avere altre funzioni, oltre a fornire resistenza agli antibiotici, quali, a titolo esemplificativo, l'aumento della tolleranza anche allo stress generale (Webber et al., 2013).

§

10. SVILUPPO DELLA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

I passaggi centrali nel percorso verso la resistenza agli antibiotici clinicamente importanti sono sostanzialmente quattro:

- 1) comparsa di nuovi fattori di resistenza,
- 2) mobilitazione,
- 3) trasferimento a patogeni umani e
- 4) disseminazione.

In particolare, non è necessario che questi passaggi avvengano in questa consequenzialità; il trasferimento ai patogeni umani può avvenire prima o dopo la disseminazione nel microbioma umano e alcune fasi del processo possono ripetersi.

I fattori di resistenza attualmente presenti nei patogeni e nei patogeni opportunisti costituisce un insieme di geni che si trovano nelle fasi successive di questo percorso.

Un fattore cruciale affinché un gene di resistenza raggiunga i patogeni umani è che venga mantenuto durante tutte queste fasi.

I geni di resistenza con *fitness cost* elevato hanno maggiori probabilità di essere persi in assenza di una pressione selettiva, in particolare se localizzati su un elemento genetico mobile.

Inoltre, uno scenario con una pressione selettiva costante da parte degli antibiotici -dall'emergenza ambientale di

un gene di resistenza al suo trasferimento a un agente patogeno umano- sembra improbabile, anche se non impossibile. Poiché le perdite di geni di resistenza sono probabili se comportano un *fitness cost* significativo, i geni recentemente mobilitati che non forniscono un evidente vantaggio in termini di *fitness cost* sono senza dubbio eliminati presto da elementi genetici mobili come i plasmidi (Baquero, Tedim e Coque, 2013).

Ciò evidenzia l'importanza che assumono gli ambienti in cui i geni di resistenza forniscono un forte vantaggio selettivo, ad esempio ambienti soggetti ad inquinamento industriale con antibiotici (Larsson, 2014a).

Poiché questi ambienti presenterebbero condizioni che favoriscono una maggiore frequenza di mutazione, una conseguenza potrebbe essere che i geni di resistenza potrebbero essere presenti in differenti varianti leggermente diverse e solamente quelle con un basso *fitness cost* vengono mantenute quando la pressione selettiva viene rimossa (ad esempio, dopo la dispersione del vettore in un ambiente non inquinato).

Considerando che il percorso di dispersione è lungo, non sorprende che i fattori di resistenza mobile trovati oggi nei patogeni siano estremamente difficili da eliminare dalle popolazioni batteriche (Löfmark et al., 2008) e sembrano presentare un basso *fitness cost* (Vogwill e Maclean, 2015). Ciò suggerisce che una volta che un gene di resistenza è ampiamente diffuso tra i patogeni umani (o anche tra i commensali umani) è difficile gestirne la diffusione: bisognerebbe intervenire prima che prenda piede nel microbioma umano.

Pertanto, il rilevamento di geni di resistenza nell'ambiente che non sono

ancora diffusi tra i batteri dovrebbe essere una componente importante nella valutazione del rischio e nella gestione della resistenza agli antibiotici (Bengtsson-Palme e Larsson, 2015).

§

11. QUANDO L'AMBIENTE RAPPRESENTA UN RISCHIO PER LA SALUTE UMANA

Il motivo principale per studiare la resistenza agli antimicrobici nell'ambiente è acquisire ulteriori informazioni sui rischi per la salute dell'uomo e degli animali domestici che spesso necessitano di antibiotici efficaci. Questa conoscenza può essere utilizzata per progettare interventi che potrebbero prevenire o ritardare l'insorgenza della resistenza ai patogeni da batteri ambientali e ridurre la diffusione di agenti patogeni resistenti.

Per identificare strategie di intervento adeguate, occorre prima definire quali ambienti costituiscono i rischi più gravi, cosa non del tutto semplice.

Alcuni studiosi hanno sostenuto che gli scenari di rischio più gravi coinvolgono geni di resistenza noti che sono stati precedentemente segnalati per risiedere su elementi genetici mobili ospitati da batteri patogeni umani (Martínez, Coque e Baquero, 2015).

Questo è un argomento valido quando tali geni si incontrano nel microbioma umano, ma trovarli nelle comunità batteriche ambientali non è necessariamente indicativo di una situazione ad alto rischio.

I ben noti geni di resistenza presenti su elementi genetici mobili si diffondono facilmente con le feci umane e il loro

rilevamento nell'ambiente esterno può essere un'indicazione di contaminazione fecale umana (Bengtsson-Palme, 2017).

I rischi associati all'inquinamento fecale umano non devono essere trascurati, ma sono principalmente legati alla diffusione di batteri già resistenti.

Pertanto, è probabile che le conseguenze cliniche del reclutamento di geni di resistenza già presenti tra i patogeni da fonti ambientali siano minori (Bengtsson-Palme e Larsson, 2015).

Il panorama del rischio può essere essenzialmente suddiviso in tre componenti principali: i rischi per la mobilitazione e la successiva stabilizzazione di (nuovi) geni di resistenza; i rischi per il reclutamento di geni di resistenza non trasportati da patogeni umani attraverso il trasferimento genico orizzontale; i rischi associati alla diffusione di batteri resistenti (patogeni e non) attraverso l'ambiente alla popolazione umana.

La selezione antibiotica può influenzare tutti questi componenti e potrebbe svolgere un ruolo importante nella diffusione di batteri resistenti che hanno l'ambiente come habitat primario, compresi i patogeni opportunisti.

Sebbene la mobilitazione dei geni di resistenza possa avvenire ovunque, pressioni selettive più forti sono direttamente correlate a rischi più elevati per il loro insediamento persistente nelle popolazioni batteriche, poiché i costi per il trasporto di geni di resistenza recentemente emersi sono probabilmente elevati.

È probabile che i geni di resistenza che non conferiscono un vantaggio in termini di fitness cost vengano rapidamente persi nelle comunità microbiche. Questo identifica gli ambienti in cui le concentrazioni di antibiotici sono

chiaramente al di sopra delle concentrazioni minime selettive (MSC) stabilite.

Ciò include il microbioma umano e animale durante il trattamento antibiotico, l'acquacoltura intensiva che fa uso di antibiotici (Cabello, 2006), nonché ambienti inquinati da elevati livelli di antibiotici di origine industriale (Larsson, 2014b).

Le condizioni che i batteri affrontano all'interno degli impianti di trattamento che trattano le acque reflue sono in gran parte inesplorate, ma è anche probabile che siano ampiamente selettive, con conseguente diversità molto limitata di batteri presenti in tali ambienti (Marathe et al., 2016).

Poiché anche le concentrazioni sub-letali di antibiotici possono selezionare per la resistenza (Lundström et al., 2016), occorre prestare attenzione alle acque reflue grezze, agli ambienti agricoli e agli STP, dove sono state determinate le concentrazioni di antibiotici intorno alle MSC previste.

Inoltre, la mobilitazione e il trasferimento dei fattori di resistenza aumentano anche durante l'esposizione agli antibiotici e similmente si verificano anche a concentrazioni di antibiotici sub-inibitori.

Pertanto, gli ambienti inquinati rappresentano ancora una volta un rischio elevato, ma le acque reflue, ad esempio, possono anche contenere concentrazioni di sostanze tossiche sufficienti per indurre il trasferimento genico orizzontale.

Per il trasferimento della resistenza ai patogeni umani è fondamentale l'abbondanza di batteri patogeni che possono fungere da riceventi. Questo significa che il microbioma umano potrebbe potenzialmente svolgere un

ruolo in questo processo e che i commensali umani possono fungere da serbatoi di resistenza intermedi (Larsson e Flach, 2021).

Il ruolo dei commensali umani nel trasferimento della resistenza dai batteri ambientali ai patogeni non è tuttavia ben studiato.

I batteri ambientali transitori potrebbero potenzialmente trasportare geni di resistenza nel microbioma umano, dove questi geni potrebbero essere trasferiti ai batteri associati all'uomo, inclusi gli agenti patogeni (opportunisti).

Tuttavia, per la maggior parte dei batteri transitori, è probabile che i tempi di interazione con i batteri associati all'uomo siano brevi.

Inoltre, gli animali possono anche fungere da ospiti intermedi per i batteri resistenti e fornire un terreno fertile per il trasferimento della resistenza ai patogeni umani (Allen et al., 2010).

I rischi associati al trasferimento di nuovi geni di resistenza ai patogeni umani negli STP appaiono leggermente inferiori a causa della mancanza di pressioni selettive e delle proporzioni inferiori di batteri associati all'uomo nell'effluente (Lundström et al., 2016), sebbene tale trasferimento non sia certamente impossibile.

Le vie di diffusione dei batteri ambientali portatori di geni di resistenza sono molto meno chiare.

Indipendentemente da ciò, il fattore più critico appare la possibilità dell'esistenza di una via di dispersione rapida verso la popolazione umana (Baquero et al., 2019). Più breve è questo percorso, maggiori sono i rischi di un particolare ambiente.

Nel loro insieme, non è chiaro come dovrebbero essere definiti gli scenari ad

alto rischio per la salute umana associati alla resistenza ambientale agli antibiotici. Tuttavia, appare ovvio che gli interventi potrebbero già essere applicati in ambienti con forti pressioni selettive da antibiotici.

Pertanto, limitare gli scarichi di rifiuti farmaceutici dalla produzione di antibiotici e ridurre l'uso non necessario di antibiotici nell'uomo, negli animali e nell'acquacoltura sono tutti importanti primi passi verso la mitigazione dello sviluppo della resistenza ambientale agli antimicrobici (Brown et al., 2017).

§

12. SCENARI FUTURI

30

Molti geni di resistenza sembrano essere associati a piccoli *fitness cost* per i loro ospiti e sono facilmente trasferibili sia tra batteri sia tra plasmidi (Henriques Normark e Normark, 2002).

I geni di resistenza a basso costo tendono a mantenersi e possono evolvere in risposta a varianti più efficienti dello stesso antibiotico (Li et al., 2017; Baquero et al., 2019).

Inoltre, sullo stesso elemento genetico mobile possono accumularsi geni di resistenza contro diversi antibiotici.

Considerando che vengono utilizzate diverse classi di antibiotici ad ampio spettro per trattare gli stessi ceppi batterici, è più probabile che tale co-localizzazione emerga nel tempo.

Una volta che due geni sono stati co-localizzati sullo stesso plasmide hanno

un vantaggio a restarvi a fronte di un'eventuale esposizione agli antibiotici. Pertanto, ci aspetteremmo di vedere un aumento di batteri con fenotipi di multiresistenza trasmessi da plasmidi e la velocità di questo aumento aumenterebbe con il tempo. In effetti, questo è ciò che è stato osservato nella pratica clinica (ECDC, 2014).

È importante sottolineare che questo aumento si presenterebbe anche se l'uso di antibiotici non aumentasse.

Eppure anche l'uso globale di antibiotici è in aumento in modo preoccupante (Laxminarayan, 2014), e ciò comporta probabilmente una ulteriore accelerazione del problema della multiresistenza.

L'uso di biocidi e metalli come antibatterici può anche promuovere la multiresistenza ai farmaci, anche se fino a che punto è un dato ancora incerto (Wales e Davies, 2015; Romero et al., 2017).

Tuttavia, la resistenza a più farmaci potrebbe non essere l'unico problema che bisognerà affrontare in futuro.

I batteri possono generare diversità genetica attraverso mutazioni, ricombinazione e trasferimento genico orizzontale.

È stato dimostrato che l'esposizione agli antibiotici aumenta le frequenze di mutazione e ricombinazione nei batteri, anche a livelli sub-inibitori, attraverso una risposta di riparazione del DNA (risposta SOS) (Baharoglu e Mazel, 2014).

È quindi probabile che l'esposizione di batteri ambientali a livelli variabili di antibiotici, generi varianti con tassi più elevati di cambiamento genetico, oltre alla selezione per la resistenza.

Poiché le popolazioni di batteri che hanno tassi di mutazione più elevati

hanno maggiori probabilità di acquisire rapidamente mutazioni benefiche, l'esposizione agli antibiotici può selezionare popolazioni batteriche con tassi generalmente più elevati di cambiamento genetico (Bengtsson-Palme, Kristiansson e Larsson, 2018).

Inoltre, gli antibiotici vengono spesso rilasciati nell'ambiente insieme a batteri che trasportano integroni e altri elementi genetici mobili (Gaze et al., 2013).

Poiché l'attività dell'integrasi è indotta anche dagli antibiotici (Maiques et al., 2006) ciò può aumentare ulteriormente l'*evolubilità batterica*, generando elementi genetici mobili sempre più complessi (Gillings, 2017).

Se tali riorganizzazioni dei geni di resistenza si uniscono a un tasso di mutazione generalmente aumentato, il risultato netto sarebbe un'evoluzione ancora più rapida verso geni di resistenza mobili con fitness cost inferiore.

È impossibile prevedere esattamente quali conseguenze questo possa avere per i pangenomi batterici (18).

Poiché gli integroni e altri elementi genetici mobili consentono ai batteri di adattarsi più rapidamente a nuove nicchie, i geni mobilitati in futuro probabilmente non si limiterebbero a conferire resistenza agli antibiotici, ma potrebbero anche comprendere geni che forniscono una maggiore capacità di adattamento ai cambiamenti ambientali.

Pertanto, i geni che consentono ai batteri di sopravvivere a condizioni abiotiche altamente variabili, gestire sostanze tossiche, utilizzare nuove fonti di carbonio, competere con altri microbi, aderire a diversi tipi di superfici, riprogettare i loro ecosistemi e consentire la formazione di spore altamente durevoli, sarebbero buoni candidati per

una mobilitazione futura (Ghaly et al., 2021).

Dal punto di vista della salute umana, è facile immaginare che la selezione mediante antibiotici favorisca ceppi che maggiormente riescono a colonizzare e invadere l'ospite umano. Ciò potrebbe includere la mobilitazione di geni coinvolti nella virulenza, nella trasmissione e nella patogenicità (Gillings, 2014), ma anche geni che aumentano la capacità competitiva con i commensali umani. Questo dipinge un'immagine di un futuro preoccupante in cui i patogeni umani non solo non sarebbero curabili dalla maggior parte degli antibiotici, ma diventerebbero anche più aggressivi e si diffonderebbero più facilmente tra gli esseri umani.

Basti pensare all'ipervirulenza con cui è apparsa la *Klebsiella pneumoniae* resistente a tutti gli antibiotici testati negli ultimi anni negli ospedali cinesi (Gu et al., 2018).

È quindi importante comprendere non solo i rischi per la trasmissione della resistenza, ma anche le conseguenze evolutive della dispersione di antibiotici nell'ambiente.

§

13. OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

Sono diversi i fattori ecologici e ambientali rilevanti per lo sviluppo e la trasmissione della resistenza agli antibiotici.

Nonostante ne emergano di nuovi, solo pochi sono selezionati in modo permanente tra le popolazioni batteriche. Di conseguenza, è probabile che quelli che riescono a raggiungere le specie patogene si evolvano, comportando un

fitness cost molto basso per i loro ospiti e saranno quindi difficili da eliminare dalle popolazioni di patogeni.

Le strategie di mitigazione di successo per lo sviluppo della resistenza ambientale sono limitate a evitare la creazione di impostazioni che selezionano, mobilitano e consentono la persistenza dei geni di resistenza nelle comunità batteriche; a ridurre le vie di dispersione dei batteri resistenti al microbioma umano, limitando la pressione selettiva per i patogeni resistenti, quindi un uso prudente di antibiotici per l'uomo e per gli animali.

La diversità dei geni di resistenza presenti nell'ambiente suggerisce che ci sono ancora molti più geni di resistenza disponibili per il reclutamento dei patogeni.

È improbabile che i geni di resistenza comuni tra le popolazioni batteriche nel microbioma umano vengano sradicati, anche in assenza di selezione di antibiotici.

Pertanto, i geni di resistenza mobile che stanno già circolando tra i patogeni umani possono facilmente riemergere durante il trattamento antibiotico.

Il reclutamento di nuovi geni di resistenza nei patogeni ha il potenziale per causare conseguenze devastanti per la salute umana, come geni di resistenza mobili contro nuovi antibiotici.

§

NOTE

(1) Sono elementi extra-cromosomici liberi nel citoplasma batterico, costituiti da DNA circolare, dotati di sistemi di replicazione e in grado quindi di duplicarsi autonomamente dal DNA

batterico. Non codificano per funzioni vitali della cellula, ma portano informazioni genetiche addizionali. Essi sono in grado di integrarsi con altri plasmidi o con il DNA cromosomiale. Inoltre, possono contenere dei geni che permettono loro di trasferirsi da una cellula all'altra: plasmidi di coniugazione.

(2) Sono costituiti da piccoli elementi mobili, privi di sistemi di replicazione e di trasposizione, costituiti da un singolo gene - di solito un gene di resistenza - detti cassette di resistenza che si integrano tra loro in unità di maggiori dimensioni che a loro volta possono andare a localizzarsi su trasposoni.

(3) A differenza dei plasmidi, tali elementi genetici non possiedono dei sistemi di replicazione e per duplicarsi devono quindi integrarsi nel DNA cromosomico o nei plasmidi cellulari attraverso il loro sistema di trasposizione. I trasposoni sono in grado di spostarsi da un punto all'altro del cromosoma grazie alla produzione dell'enzima trasposasi codificato da un gene localizzato sul trasposone stesso].

(4) Sequenze di basi di DNA in grado di trasferirsi da una posizione all'altra del genoma batterico. L'inserzione di una o più basi nella sequenza normale del DNA si verifica in seguito a mutazione. Le IS determinano l'inattività del gene che si riattiva con la loro rimozione; si trovano anche alle due estremità degli elementi genetici trasponibili, come i trasposoni.

(5) Le porine sono proteine transmembranose, organizzate in triplette, che danno origine ad una struttura cilindrica cava; tale canale consente l'ingresso e la diffusione del farmaco nella cellula.

(6) Sono meccanismi di trasporto attivo che utilizzano canali proteici energia-dipendenti.

(7) dall'inglese penicillin binding protein, sono proteine leganti la penicillina, appartenenti alla classe delle transpeptidasi. Queste fanno parte della membrana citoplasmatica dei batteri - sia Gram positivi sia Gram negativi - e svolgono importanti funzioni biosintetiche, partecipando alle ultime fasi della formazione del peptidoglicano, il maggior componente della parete batterica.

(8) Il meccanismo di efflusso più noto riguarda la tetraciclina. I prodotti dei geni Tet sono delle proteine transmembranali che trasportano attivamente le tetracicline dall'interno all'esterno della cellula batterica, impedendo l'accumulo dell'antibiotico.

(9) Si realizza tramite la comparsa di mutazioni spontanee dell'informazione genetica, ossia modificazioni ereditabili nella sequenza di basi che compongono il DNA microbico, che rendono il batterio insensibile all'azione del farmaco. Può essere indotta anche da agenti mutageni indipendente dall'utilizzo di antibiotico. Fa parte dei normali meccanismi di evoluzione dei batteri

(10) questo tipo di resistenza origina per acquisizione di elementi genetici mobili contenenti uno o più geni di resistenza che penetrano nella cellula.

(11) Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'11 dicembre 2018, relativo ai medicinali veterinari e che abroga la direttiva 2001/82/CE <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32019R0006>

(12) Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, sugli additivi destinati all'alimentazione animale
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02003R1831-20210327&from=IT>

(13) Antiparassitari non agricoli utilizzati per eliminare, neutralizzare o impedire l'azione di qualsiasi organismo nocivo per l'uomo e gli animali.

(14) Inteso come la totalità del patrimonio genetico posseduto dal microbiota, ossia i geni che quest'ultimo è in grado di esprimere.

(15) La collezione di tutti i geni che possono contribuire alla resistenza antibiotica.

(16) Lo sviluppo di resistenza costa al batterio in termini di benessere: i batteri resistenti crescono più lentamente e la replicazione di ulteriori plasmidi comporta un enorme consumo energetico. Inoltre, le mutazioni ribosomiali che conferiscono resistenza alterano la sintesi di proteine. L'entità del fitness cost è il principale parametro biologico che influenza la quota di sviluppo, la stabilizzazione e la possibile reversione della resistenza nel tempo: ciò permetterà a batteri suscettibili di competere con i batteri resistenti qualora la pressione selettiva dovuta agli antibiotici si riducesse.

(17) È una tecnica clinico-statistica quantitativa che permette di combinare i dati di più studi condotti su di uno stesso argomento.

(18) È l'intero patrimonio genetico di una data specie, dal greco pan (intero) e genoma (Mira et al., 2010; Mira A, Martín-Cuadrado AB, D'Auria G, Rodríguez-Valera F. The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int Microbiol.* 2010

Jun;13(2):45-57:

<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/11019>

§

BIBLIOGRAFIA

-Aarestrup, F. M. (2015) «The livestock reservoir for antimicrobial resistance: A personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670). doi: 10.1098/rstb.2014.0085.

-Akiba, T. et al. (1960) «On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of shigella», *Japanese Journal of Microbiology*, 4(2), pagg. 219–227. doi: 10.1111/j.1348-0421.1960.tb00170.x.

-Allen, H. K. et al. (2010) «Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments», *Nature Reviews Microbiology*, pagg. 251–259. doi: 10.1038/nrmicro2312.

-Allen, H. K. (2014) «Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals», *Current Opinion in Microbiology*, pagg. 25–29. doi: 10.1016/j.mib.2014.06.001.

-Aminov, R. I. (2010) «A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future», *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC). doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.

- Anderson, R., Higgins Jr, H. M. e Pettinga, C. D. (1961) «*Symposium: how a drug is born*», Cincinnati Journal of Medicine, 42, pagg. 49–60.
- Andersson, D. I. e Hughes, D. (2010) «*Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance?*», Nature Reviews Microbiology, pagg. 260–271. doi: 10.1038/nrmicro2319.
- Andrew, W. (2006) «*Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia Norwich*», New York, USA: William Andrew.
- Antonelli, G. et al. (2017) *Principi di microbiologia medica*. A cura di C. E. Ambrosiana.
- Apata, D. F. (2009) «*Antibiotic resistance in poultry*», International Journal of Poultry Science, 8(4), pagg. 404–408. doi: 10.3923/ijps.2009.404.408.
- Arzanlou, M., Chai, W. C. e Venter, H. (2017) «*Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria*», Essays in Biochemistry, pagg. 49–59. doi: 10.1042/EBC20160063.
- Baharoglu, Z. e Mazel, D. (2014) «*SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions*», FEMS Microbiology Reviews, pagg. 1126–1145. doi: 10.1111/1574-6976.12077.
- Baquero, F. et al. (2019) «*Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance*», Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2019.02892.
- Baquero, F., Martínez, J. L. e Cantón, R. (2008) «*Antibiotics and antibiotic resistance in water environments*», Current Opinion in Biotechnology, pagg. 260–265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Baquero, F., Tedim, A. P. e Coque, T. M. (2013) «*Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria*», Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2013.00015.
- Bell, B. G. et al. (2014) «*A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance*», BMC Infectious Diseases, 14(1). doi: 10.1186/1471-2334-14-13.
- Bell, R. L. et al. (2021) «*The persistence of bacterial pathogens in surface water and its impact on global food safety*», Pathogens. doi: 10.3390/pathogens10111391.
- Bellino, S. et al. (2019) *Rapporto AR-ISS - I dati 2020, Epicentro*. Available at: <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss-rapporto-streptococcus-pneumoniae#writers>.
- Bengtsson-Palme, J. et al. (2016) «*Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics*», Science of the Total Environment, 572, pagg. 697–712. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.228.
- Bengtsson-Palme, J. (2017) «*Antibiotic resistance in the food supply chain: where can sequencing and metagenomics aid risk assessment?*», Current Opinion in Food Science, pagg. 66–71. doi: 10.1016/j.cofs.2017.01.010.

- Bengtsson-Palme, J., Jonsson, V. e Heß, S. (2021) «*What Is the Role of the Environment in the Emergence of Novel Antibiotic Resistance Genes? A Modeling Approach*», *Environmental Science and Technology*, 55(23), pagg. 15734–15743. doi: 10.1021/acs.est.1c02977.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E. e Larsson, D. G. J. (2018) «*Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance*», *FEMS Microbiology Reviews*, pagg. 68–80. doi: 10.1093/femsre/fux053.
- Bengtsson-Palme, J. e Larsson, D. G. J. (2015) «*Antibiotic resistance genes in the environment: Prioritizing risks*», *Nature Reviews Microbiology*, pag. 396. doi: 10.1038/nrmicro3399-c1.
- Berg, G. et al. (2013) «*The Rhizosphere as a Reservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria*», in *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, pagg. 1209–1216. doi: 10.1002/9781118297674.ch116.
- Berg, G., Eberl, L. e Hartmann, A. (2005) «*The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria*», *Environmental Microbiology*, pagg. 1673–1685. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x.
- Blázquez, J. et al. (2012) «*Antimicrobials as promoters of genetic variation*», *Current Opinion in Microbiology*, pagg. 561–569. doi: 10.1016/j.mib.2012.07.007.
- Bongaerts, G. P. A. e Kaptijn, G. M. P. (1981) «*Aminoglycoside phosphotransferase-II-mediated amikacin resistance in Escherichia coli*», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20(3), pagg. 344–350. doi: 10.1128/AAC.20.3.344.
- Bonnedahl, J. et al. (2009) «*Dissemination of Escherichia coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France*», *PLoS ONE*, 4(6). doi: 10.1371/journal.pone.0005958.
- Brown, L. et al. (2017) «*Antimicrobial resistance: A call to action!*», *Clinical Infectious Diseases*, pagg. 106–107. doi: 10.1093/cid/ciw678.
- Burwen, D. R., Banerjee, S. N. e Gaynes, R. P. (1994) «*Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States*», *Journal of Infectious Diseases*, 170(6), pagg. 1622–1625. doi: 10.1093/infdis/170.6.1622.
- Bush, K. e Bradford, P. A. (2016) « *β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview*», *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Butler, M. S. et al. (2014) «*Glycopeptide antibiotics: Back to the future*», *Journal of Antibiotics*, pagg. 631–644. doi: 10.1038/ja.2014.111.
- Cabello, F. C. (2006) «*Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment*», *Environmental Microbiology*, pagg. 1137–1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.

- Calza, L. (2013) *Principi di Malattie Infettive*, Principi di Malattie Infettive. doi: 10.15651/978-88-748-8593-0.
- Castanheira, M. et al. (2007) «*First report of plasmid-mediated qnrA1 in a ciprofloxacin-resistant Escherichia coli strain in Latin America*», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), pagg. 1527–1529.
- CDC (2013) *Centre for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease-Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*, CDC. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- Cheng, G. et al. (2019) «*Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production*», *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. doi: 10.1186/s13756-019-0623-2.
- Di Chiro, A. (2017) «*La terra e lo spirito. Questioni e personalità della filosofia in Molise tra Ottocento e Novecento*», in Carabba (a c. di). Lanciano, pagg. 127–174.
- Crofton, J. e Mitchison, D. A. (1948) «*Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis*», *British Medical Journal*, 2(4588), pagg. 1009–1015. doi: 10.1136/bmj.2.4588.1009.
- De Boeck, H. et al. (2012) «*ESBL-positive enterobacteria isolates in drinking water*», *Emerging Infectious Diseases*, pagg. 1019–1020. doi: 10.3201/eid1806.111214.
- Depardieu, F. et al. (2003) «*The vanG glycopeptide resistance operon from Enterococcus faecalis revisited*», *Molecular Microbiology*, 50(3), pagg. 931–948. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03737.x.
- Dingemans, N. J. e Wolf, M. (2010) «*Recent models for adaptive personality differences: A review*», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, pagg. 3947–3958. doi: 10.1098/rstb.2010.0221.
- ECDC (2014) «*Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*», EARS-Net, (November), pag. 118.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2015) *Commission Notice — Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C 299/04)*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52015XC0911%2801%29>.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2017) «*EU guidelines for the prudent use of antimicrobials in human health*», European Commission: Health and Food Safety, pagg. 1–21.
- Evans, B. R. e Leighton, F. A. (2014) «*A history of One Health*», *OIE Revue Scientifique et Technique*. doi: 10.20506/rst.33.2.2298.
- FDA (2010) *Forest Laboratories, Inc. Announces FDA Approval of Teflaro (TM) (ceftaroline fosamil) for the Treatment of Community-Acquired Bacterial Pneumonia and Acute Bacterial Skin and Skin Structure*

- Infection*. Available at: <https://www.biospace.com/article/release/s/forest-laboratories-inc-announces-fda-approval-of-teflaro-tm-ceftaroline-fosamil-for-the-treatment-of-community-acquired-bacterial-pneumonia-and/>
- FDA (2015) *AVYCAZ safely and effectively* [Online]. *Forest Pharmaceuticals: FDA*. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/206494s000lbl.pdf.
- Fischer, J. e Ganellin, C. R. (2010) *Analogue-Based Drug Discovery II*. doi: 10.1002/9783527630035.
- Founou, L. L., Founou, R. C. e Essack, S. Y. (2016) «*Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective*», *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01881.
- Frieri, M., Kumar, K. e Boutin, A. (2017) «*Antibiotic resistance*», *Journal of Infection and Public Health*, pagg. 369–378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
- Frost, R. O., Steketee, G. e Williams, L. (2000) «*Hoarding: A community health problem*», *Health and Social Care in the Community*. doi: 10.1046/j.1365-2524.2000.00245.x.
- Gaze, W. H. et al. (2013) «*Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome*», *Emerging Infectious Diseases*, 19(7). doi: 10.3201/eid1907.120871.
- Ghaly, T. M. et al. (2017) «*Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria*», *PLoS ONE*, 12(6). doi: 10.1371/journal.pone.0179169.
- Ghaly, T. M. et al. (2021) «*The natural history of integrons*», *Microorganisms*. doi: 10.3390/microorganisms9112212.
- Giguère, S., Prescott, J. e Dowling, P. (2013) *Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction. Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine 5 th edn.*, Blackwell.
- Gillings, M. R. (2014) «*Integrons: Past, Present, and Future*», *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), pagg. 257–277. doi: 10.1128/mmbr.00056-13.
- Gillings, M. R. (2017) «*Class 1 integrons as invasive species*», *Current Opinion in Microbiology*, pagg. 10–15. doi: 10.1016/j.mib.2017.03.002.
- Gorny, R. L. e Dutkiewicz, J. (2002) «*Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries*», *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, pagg. 17–23.
- Greene, W. H. et al. (1973) «*Pseudomonas aeruginosa resistant to carbenicillin and gentamicin. Epidemiologic and clinical aspects in a cancer center*», *Annals of Internal Medicine*, 79(5), pagg. 684–689. doi: 10.7326/0003-4819-79-5-684.
- Gu, D. et al. (2018) «*A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study*», *The Lancet Infectious Diseases*, 18(1), pagg. 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9.

- Hansman, D. et al. (1974) «Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea.», *The Medical journal of Australia*, 2(10), pagg. 353–356. doi: 10.5694/j.1326-5377.1974.tb70836.x.
- Harris, M. (1964) «Pharmaceutical Microbiology», *Journal of Medical Education*, 39(11). Available at: https://journals.lww.com/academicmedicine/Fulltext/1964/11000/Pharmaceutical_Microbiology.34.aspx.
- Harwood, V. J. et al. (2014) «Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes», *FEMS Microbiology Reviews*, pagg. 1–40. doi: 10.1111/1574-6976.12031.
- Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. e Slack, A. (2004) «Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance», *Trends in Microbiology*, pagg. 401–404. doi: 10.1016/j.tim.2004.07.003.
- Henriques Normark, B. e Normark, S. (2002) «Evolution and spread of antibiotic resistance», *Journal of Internal Medicine*, pagg. 91–106. doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x.
- Hernando-Amado, S. et al. (2017) «Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance», *Essays in Biochemistry*, pagg. 37–48. doi: 10.1042/EBC20160057.
- Hernando-Amado, S. et al. (2020) «Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health», *Frontiers in Microbiology*.
- doi: 10.3389/fmicb.2020.01914.
- Hiltunen, T., Virta, M. e Anna-Liisa, L. (2017) «Antibiotic resistance in the wild: An ecoevolutionary perspective», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712). doi: 10.1098/rstb.2016.0039.
- Holmes, A. H. et al. (2016) «Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance», *The Lancet*, pagg. 176–187. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- Humphries, R. M. et al. (2015) «First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), pagg. 6605–6607. doi: 10.1128/AAC.01165-15.
- Intorre Luigi (2009) «La resistenza microbica ai chemioterapici», in Carli, S., Ormas, P., Re, G. & S. G. (a c. di) *Farmacologia Veterinaria*. Napoli: Idelson-Gnocchi.
- Jevons, M. P. (1961) «“Celbenin” - resistant Staphylococci», *British Medical Journal*, pagg. 124–125. doi: 10.1136/bmj.1.5219.124-a.
- John, J. F. et al. (1982) «Evidence for a chromosomal site specifying amikacin resistance in multiresistant *Serratia marcescens*», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(4), pagg. 587–591. doi: 10.1128/AAC.21.4.587.
- Johnning, A. et al. (2013) «Acquired genetic mechanisms of a multiresistant bacterium isolated from a treatment plant

receiving wastewater from antibiotic production», *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), pagg. 7256–7263.
doi: 10.1128/AEM.02141-13.

-Johnson, A. P. et al. (1990) «Resistance to vancomycin and teicoplanin: An emerging clinical problem», *Clinical Microbiology Reviews*, pagg. 280–291.
doi: 10.1128/CMR.3.3.280.

-Jones, W. F., Nichols, R. L. e Finland, M. (1956) «Development of Resistance and Cross-Resistance in vitro to Erythromycin, Carbomycin, Spiramycin, Oleandomycin and Streptogramin», *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 93(2), pagg. 388–393.
doi: 10.3181/00379727-93-22766.

-Jorgensen, J. H. e Ferraro, M. J. (2009) «Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices», *Clinical Infectious Diseases*, pagg. 1749–1755.
doi: 10.1086/647952.

-Jutkina, J. et al. (2016) «An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance», *Science of the Total Environment*, 548–549, pagg. 131–138.
doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.044.

-Karkman, A. et al. (2016) «High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant», *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3).
doi: 10.1093/femsec/fiw014.

-Knothe, H. et al. (1983) «Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical

isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*», *Infection*, 11(6), pagg. 315–317.
doi: 10.1007/BF01641355.

-Kümmerer, K. (2009) «Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I», *Chemosphere*, pagg. 417–434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.

-Larsson, D. G. J. (2014a) «Antibiotics in the environment», *Upsala Journal of Medical Sciences*, pagg. 108–112.
doi: 10.3109/03009734.2014.896438.

-Larsson, D. G. J. (2014b) «Pollution from drug manufacturing: Review and perspectives», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2013.0571.

-Larsson, D. G. J. e Flach, C. F. (2021) «Antibiotic resistance in the environment», *Nature Reviews Microbiology*. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.

-Laxminarayan, R. (2014) «Antibiotic effectiveness: Balancing conservation against innovation», *Science*, pagg. 1299–1301.
doi: 10.1126/science.1254163.

-Leclercq, R. et al. (1988) «Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*», *New England Journal of Medicine*, 319(3), pagg. 157–161.
doi: 10.1056/nejm198807213190307.

-Leggett, M. J. et al. (2012) «Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance», *Journal of Applied Microbiology*, pagg. 485–498.

doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x.

-Lennon, J. T. e Jones, S. E. (2011) «Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy», *Nature Reviews Microbiology*, pagg. 119–130.
doi: 10.1038/nrmicro2504.

-Lesch, J. E. (2007) *The first miracle drugs: how the sulfa drugs transformed medicine*. Oxford University Press, USA.

-Levin, B. R. et al. (1997) «The population genetics of antibiotic resistance», *Clinical Infectious Diseases*, 24 (1 SUPPL.).
doi: 10.1093/clinids/24.supplement_1.s9.

-Levin, B. R., Baquero, F. e Johnsen, P. J. (2014) «A model-guided analysis and perspective on the evolution and epidemiology of antibiotic resistance and its future», *Current Opinion in Microbiology*, pagg. 83–89.
doi: 10.1016/j.mib.2014.06.004.

-Levine, J. F. et al. (1985) «Amikacin-resistant gram-negative bacilli: Correlation of occurrence with amikacin use», *Journal of Infectious Diseases*, 151(2), pagg. 295–300.
doi: 10.1093/infdis/151.2.295.

-Lewis, K. (2013) «Platforms for antibiotic discovery», *Nature Reviews Drug Discovery*, pagg. 371–387.
doi: 10.1038/nrd3975.

-Li, J. et al. (2017) «Antimicrobial activity and resistance: Influencing factors», *Frontiers in Pharmacology*.
doi: 10.3389/fphar.2017.00364.

-Li, J. J. e Corey, E. J. (2013) *Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives*, *Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives*.
doi: 10.1002/9781118354483.

-Livermore, D. M. (2000) «Epidemiology of antibiotic resistance», in *Intensive Care Medicine, Supplement*.
doi: 10.1111/j.1469-0691.1997.tb00940.x.

-Livermore, D. M. (2003) «Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact», *Clinical Infectious Diseases*, 36(SUPPL. 1). doi: 10.1086/344654.

-Löfmark, S. et al. (2008) «Restored fitness leads to long-term persistence of resistant *Bacteroides* strains in the human intestine», *Anaerobe*, 14(3), pagg. 157–160.
doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.02.003.

-Lundström, S. V. et al. (2016) «Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms», *Science of the Total Environment*, 553, pagg. 587–595.
doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.103.

-Lupo, A., Coyne, S. e Berendonk, T. U. (2012) «Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies», *Frontiers in Microbiology*.
doi: 10.3389/fmicb.2012.00018.

-Maiques, E. et al. (2006) « β -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*», *Journal of Bacteriology*, 188(7), pagg. 2726–2729.
doi: 10.1128/JB.188.7.2726-2729.2006.

- Mangili, A. et al. (2005) «Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia», *Clinical infectious diseases*, 40 (7), pagg. 1058–1060.
- Marathe, N. P. et al. (2016) «Limited bacterial diversity within a treatment plant receiving antibiotic containing waste from bulk drug production», *PLoS ONE*, 11(11).
doi: 10.1371/journal.pone.0165914.
- Marshall, B. M. e Levy, S. B. (2011) «Food animals and antimicrobials: Impacts on human health», *Clinical Microbiology Reviews*, pagg. 718–733.
doi: 10.1128/CMR.00002-11.
- Martinez, J. L. (2014) «General principles of antibiotic resistance in bacteria», *Drug Discovery Today: Technologies*, pagg. 33–39.
doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001.
- Martínez, J. L. (2012) «Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens», *Frontiers in Microbiology*, 2(JAN).
doi: 10.3389/fmicb.2011.00265.
- Martínez, J. L., Coque, T. M. e Baquero, F. (2015) «What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes», *Nature Reviews Microbiology*, pagg. 116–123.
doi: 10.1038/nrmicro3399.
- Matte-Tailliez, O. et al. (2002) «Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins», *Molecular Biology and Evolution*, 19(5), pagg. 631–639. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004122.
- Mattner, F. et al. (2012) «Preventing the spread of multidrug-resistant gram-negative pathogens: Recommendations of an expert panel of the German Society for Hygiene and Microbiology», *Deutsches Arzteblatt International*, 109(3), pagg. 39–45.
doi: 10.3238/arztebl.2012.0039.
- Melnyk, A. H., Wong, A. e Kassen, R. (2015) «The fitness costs of antibiotic resistance mutations», *Evolutionary Applications*, 8(3), pagg. 273–283.
doi: 10.1111/eva.12196.
- Menkem, Z. E. et al. (2019) «Antibiotic residues in food animals: Public health concern», *Acta Ecologica Sinica*, 39(5), pagg. 411–415.
doi: 10.1016/j.chnaes.2018.10.004.
- Mosalaei, S. et al. (2021) «Assessment of fungal bioaerosols and particulate matter characteristics in indoor and outdoor air of veterinary clinics», *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(2), pagg. 1773–1780.
doi: 10.1007/s40201-021-00732-8.
- Murray, B. E. (2000) «Vancomycin-resistant enterococcal infections», *New England Journal of Medicine*, 342 (10), pagg. 710–721.
- Nathan, C. (2004) «Antibiotics at the crossroads», *Nature*, pagg. 899–902.
doi: 10.1038/431899a.
- Pal, C. et al. (2016) «The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes», *Microbiome*, 4. doi: 10.1186/s40168-016-0199-5.
- Pearl. Mary C (2007) *Perdue Too Chicken to Quit Antibiotics Cold Turkey*

Antibiotic use on the farm hurts people—and doesn't help the bottom line., DIScover. Available at: <https://web.archive.org/web/20070925063617/http://discovermagazine.com/2007/sep/better-planet>.

-Perciaccante, A. et al. (2019) «Vincenzo Tiberio (1869–1915) and the dawn of the antibiotic age», *Internal and Emergency Medicine*, pagg. 1363–1364. doi: 10.1007/s11739-019-02116-1.

-Perron, G. G. et al. (2015) «Fighting microbial drug resistance: A primer on the role of evolutionary biology in public health», *Evolutionary Applications*, pagg. 211–222. doi: 10.1111/eva.12254.

-Philippot, L. et al. (2010) «The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks», *Nature Reviews Microbiology*, pagg. 523–529. doi: 10.1038/nrmicro2367.

-Plaza-Rodríguez, C. et al. (2021) «Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany?», *Frontiers in Veterinary Science*, 7. doi: 10.3389/fvets.2020.627821.

-Ramsey, C. H. e Edwards, P. R. (1961) «Resistance of Salmonellae isolated in 1959 and 1960 to tetracyclines and chloramphenicol», *Applied microbiology*, 9(5), pagg. 389–391.

-Rasko, D. A. et al. (2011) «Origins of the E. coli Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany», *New England Journal of Medicine*, 365(8), pagg. 709–717. doi: 10.1056/nejmoa1106920.

-Res, R., Hoti, K. e Charrois, T. L. (2017) «Pharmacists' perceptions regarding optimization of antibiotic prescribing in the community», *Journal of pharmacy practice*, 30(2), pagg. 146–153.

-Rizzo, L. et al. (2013) «Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review», *Science of the Total Environment*, pagg. 345–360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.

-Rolain, J. M. (2013) «Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes», *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2013.00173.

-Romero, J. L. et al. (2017) «Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds», *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01650.

-Roy, J. (2011) *An Introduction to Pharmaceutical Sciences: Production, Chemistry, Techniques and Technology*, *An Introduction to Pharmaceutical Sciences: Production, Chemistry, Techniques and Technology*. doi: 10.1533/9781908818041.

-Salyers, A. A., Gupta, A. e Wang, Y. (2004) «Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes», *Trends in Microbiology*, pagg. 412–416. doi: 10.1016/j.tim.2004.07.004.

- Schatz, A., Bugie, E. e Waksman, S. A. (2005) «Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944.», *Clinical orthopaedics and related research*, 437, pagg. 3–6. doi: 10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe.
- Seier-Petersen, M. A. et al. (2014) «Effect of subinhibitory concentrations of four commonly used biocides on the conjugative transfer of Tn916 in *Bacillus subtilis*», *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), pagg. 343–348. doi: 10.1093/jac/dkt370.
- Sensi, P. (1983) «History of the development of rifampin», *Reviews of Infectious Diseases*, 5, pagg. S402–S406. doi: 10.1093/clinids/5.Supplement_3.S402.
- Serra-Burriel, M. et al. (2020) «Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis», *PLoS ONE*, 15(1). doi: 10.1371/journal.pone.0227139.
- Shoemaker, N. B. et al. (2001) «Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon», *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), pagg. 561–568. doi: 10.1128/AEM.67.2.561-568.2001.
- Sievert, D. M. et al. (2008) «Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006», *Clinical Infectious Diseases*, 46(5), pagg. 668–674. doi: 10.1086/527392.
- SITOX Società Italiana di Tossicologia (2019) Residui di farmaci veterinari negli alimenti: le regole UE, analisi e risultati. Available at: <https://www.sitox.org/blog-sitox/residui-di-farmaci-veterinari-negli-alimenti-le-regole-ue-analisi-e-risultati-2019-10-23>.
- SITOX Società Italiana di Tossicologia (2020) Antibiotici: dalla loro scoperta alla resistenza batterica. Available at: <https://www.sitox.org/blog-sitox/antibiotici-dalla-loro-scoperta-alla-resistenza-batterica-2020-11-17#null>
- Smillie, C. S. et al. (2011) «Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome», *Nature*, 480(7376), pagg. 241–244. doi: 10.1038/nature10571.
- Smith, G. N. e Worrel, C. S. (1949) «Enzymatic reduction of chloramphenicol», *Archives of biochemistry*, 24(1), pagg. 216–223.
- Soge, O. O. et al. (2012) «Emergence of increased azithromycin resistance during unsuccessful treatment of neisseria gonorrhoeae infection with azithromycin (Portland, OR, 2011)», *Sexually Transmitted Diseases*, 39(11), pagg. 877–879. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3182685d2b.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G. e Church, G. M. (2009) «Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora», *Science*, 325(5944), pagg. 1128–1131. doi: 10.1126/science.1176950.
- Sommer, M. O., Church, G. M. e Dantas, G. (2010) «A functional

metagenomic approach for expanding the synthetic biology toolbox for biomass conversion», *Molecular Systems Biology*, 6. doi: 10.1038/msb.2010.16.

-Stamm, W. E. e Hooton, T. M. (1993) «Management of urinary tract infections in adults», *New England journal of medicine*, 329(18), pagg. 1328–1334.

-Steinhagen, H. (2011) «The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs. By Enrique Raviña.», *ChemMedChem*, 6(9), pagg. 1746–1747.
doi: 10.1002/cmdc.201100321.

-Stokstad, E. L. R. e Jukes, T. H. (1951) «Effect of Various Levels of Vitamin B12 Upon Growth Response Produced by Aureomycin in Chicks», *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 76(1), pagg. 73–76.
doi: 10.3181/00379727-76-18391.

-Tamburello, M. e Villone, G. (2017) «Vincenzo Tiberio: la prima antibiotico terapia sperimentale in vivo», *MEDICINA NEI SECOLI ARTE E SCIENZA*, 29(2), pagg. 533–552.

-Telenti, A. et al. (1993) «Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*», *The Lancet*, 341(8846), pagg. 647–651.
doi: 10.1016/0140-6736(93)90417-F.

-Török, M. E., Moran, E. D. e Cooke, F. J. (2017) «Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology. Great Clarendon Street». Oxford, OX2 6DP, UK.

-Troillet, N., Samore, M. H. e Carmeli, Y. (1997) «Imipenem-resistant

Pseudomonas aeruginosa: risk factors and antibiotic susceptibility patterns», *Clinical infectious diseases*, 25(5), pagg. 1094–1098.

-Tsai, F. C. e Macher, J. M. (2005) «Concentrations of airborne culturable bacteria in 100 large US office buildings from the BASE study», in *Indoor Air, Supplement*, pagg. 71–81.
doi: 10.1111/j.1600-0668.2005.00346.x.

-Tsiodras, S. et al. (2001) «Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*», *Lancet*, 358(9277), pagg. 207–208.
doi: 10.1016/S0140-6736(01)05410-1.

-Tsukamura, M. (1972) «The pattern of resistance development to rifampicin in *mycobacterium tuberculosis*», *Tubercle*, 53(2), pagg. 111–117.
doi: 10.1016/0041-3879(72)90027-X.

-UMEZAWA, H. et al. (1957) «Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin», *The Journal of antibiotics*, 10(5), pagg. 181–188.
doi: 10.11554/antibioticsa.10.5_181.

-Uttley, A. C. (1988) «Vancomycin-resistant enterococci», *Lancet*, 2, pagg. 57–58.

-Ventola, C. L. (2015) «The antibiotic resistance crisis: causes and threats: Part 1: Causes and Threats», *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), pagg. 277–283. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
<http://www.pub>

medcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521.

-Vincenzo, T. (1895) «Sugli estratti di alcune muffe», *Annali d'igiene sperimentale*, (V), pagg. 91–103. Available at: https://books.google.com/books/download/Annali_d_igiene_sperimentale.pdf?id=T8l_d3EEGi0C&output=pdf.

-Vogwill, T. e Maclean, R. C. (2015) «The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: A meta-analysis approach», *Evolutionary Applications*, 8(3), pagg. 284–295. doi: 10.1111/eva.12202.

-WAISBREN, B. A. e SPINK, W. W. (1950) «A clinical appraisal of neomycin», *Annals of internal medicine*, 33(5), pagg. 1099–1119. doi: 10.7326/0003-4819-33-5-1099.

-Wales, A. D. e Davies, R. H. (2015) «Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens», *Antibiotics*, pagg. 567–604. doi: 10.3390/antibiotics4040567.

-Watanakunakorn, C. (1976) «Clindamycin therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical relapse and development of resistance to clindamycin, lincomycin and erythromycin», *The American journal of medicine*, 60(3), pagg. 419–425.

-Webber, M. A. et al. (2013) «Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance», *mBio*, 4(4). doi: 10.1128/mBio.00273-13.

-Weinberg, E. D. e Tonnis, S. M. (1967) «Role of manganese in biosynthesis of bacitracin», *Canadian Journal of Microbiology*, 13(5), pagg. 614–615. doi: 10.1139/m67-079.

-Wheeler, E. et al. (2012) «Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in galápagos reptiles», *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), pagg. 56–67. doi: 10.7589/0090-3558-48.1.56.

-WHO (2017) «Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria: Application of a One Health Approach», *World Health Organization*, pag. 87. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255747/9789241512411-eng.pdf;jsessionid=1710DEAA0E355CB99450559C0DD0C8?sequence=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255747/1/9789241512411-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/>

-Wiedenbeck, J. e Cohan, F. M. (2011) «Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches», *FEMS Microbiology Reviews*, pagg. 957–976. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x.

Worsley-Tonks, K. E. L. et al. (2021) «Comparison of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Urban Raccoons and Domestic Dogs», *Applied and Environmental Microbiology*, 87(15), pagg. 1–14. doi: 10.1128/AEM.00484-21.

-Youmans, G. P. e Williston, E. H. (1946) «Effect of Streptomycin on Experimental Infections Produced in Mice with Streptomycin Resistant Strains



F. BELLINI, A. CAL, A. LIVERINI, G. PAGANI, S. ZACCHETTI

of *M. tuberculosis* var. *Hominis*», Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 63(1), pagg. 131–134.

doi: 10.3181/00379727-63-15523.

-Zaffiri, L., Gardner, J. e Toledo-Pereyra, L. H. (2012) «History of antibiotics. from salvarsan to cephalosporins», Journal of Investigative Surgery, pagg. 67–77.

doi: 10.3109/08941939.2012.664099.

-Zeballos-Gross, D. et al. (2021) «The Role of Gulls as Reservoirs of Antibiotic Resistance in Aquatic Environments: A Scoping Review», Frontiers in Microbiology.

doi: 10.3389/fmicb.2021.703886.

-Zhang, T. et al. (2019) «Time-resolved spread of antibiotic resistance genes in highly polluted air», Environment International, 127, pagg. 333–339.

doi: 10.1016/j.envint.2019.03.006.

-Zhang, Y. et al. (2017) «Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera», Environmental Science and Technology, 51(1), pagg. 570–580.

doi: 10.1021/acs.est.6b03132.